

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



**REGULACIÓN POR ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS DE
LA GLIOSIS TRAS LESIONES CEREBRALES EN RATA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

George Emilio Sampaio Barreto

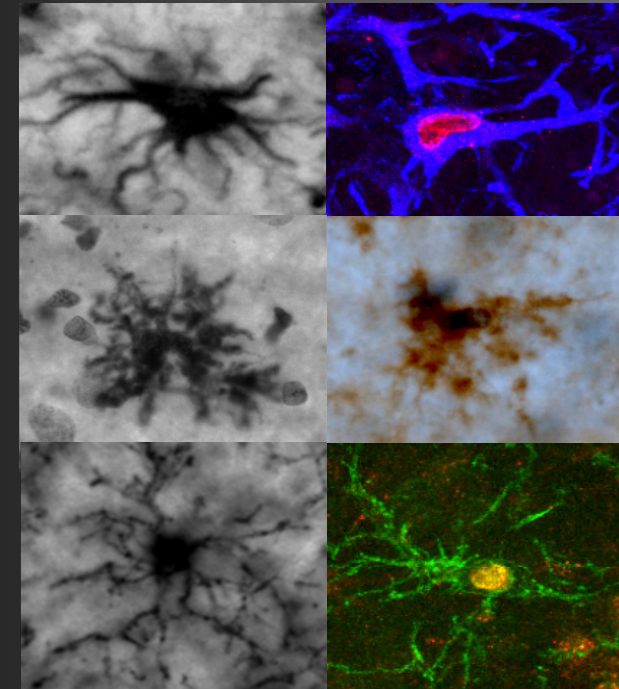
Bajo la dirección de los doctores
Luis Miguel García-Segura y Iñigo Azcoitia Elías

Madrid, 2009

- **ISBN: 978-84-692-3674-1**



REGULACIÓN POR ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS DE LA GLIOSIS TRAS LESIONES CEREBRALES EN LA RATA



George Emilio Sampaio Barreto

Madrid 2008



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



REGULACIÓN POR ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS DE LA GLIOSIS TRAS LESIONES CEREBRALES EN LA RATA

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas que presenta

George Emilio Sampaio Barreto

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección de los Drs. Luis Miguel García-Segura e Iñigo Azcoitia Elías

Vº Bueno del Director

Vº Bueno del Co-Director

Luis Miguel García-Segura

Iñigo Azcoitia Elías

El interesado

George Emílio Sampaio Barreto

Madrid 2008

Luis Miguel García-Segura, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación del Instituto de Neurociencias “Ramón y Cajal”, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Iñigo Azcoitia Elías, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular de Investigación de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada “Regulación por andrógenos y estrógenos de la gliosis tras lesiones cerebrales en la rata” ha sido realizada bajo nuestra dirección por **George Emilio Sampaio Barreto**, en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y en el Laboratorio de Esteroides Neuroactivos, del Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal del CSIC, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Madrid, el 7 de Noviembre de 2008.

Fdo. Luis Miguel García Segura
Profesor de Investigación

Fdo. Iñigo Azcoitia Elías
Profesor Titular UCM

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo supone para mí el final de una etapa y el comienzo de una nueva, por el momento desconocida y llena de interrogantes. Dicen que más vale lo malo conocido que lo bueno por conocer, pero durante estos casi 3 años (uff!) que he pasado en Madrid he conocido pocas cosas malas. Y, por supuesto, han sido muchas e inolvidables cosas buenas...

Ello debo agradecerse, en primer lugar, a mi director de tesis, Luis Miguel García Segura, que me dio la oportunidad de empezar y terminar esta tesis doctoral. Simplemente, eres el mejor jefe que he tenido nunca! Eres una persona fantástica, un amigo. Creo poder presumir de haberme empapado de su manera de entender la ciencia, su manera de mirar hacia el horizonte y sacar cosas donde no hay "posibles" explicaciones. Aprendí contigo una manera de mirar la investigación de un modo diferente, más innovador, sorprendente, interesante y ¿Por qué no más simple? Te lo agradezco de corazón... Muchísimas Gracias por tu paciencia, críticas, consejos y opiniones.

Quiero agradecer enormemente a mi Co-director de Tesis, Iñigo Azcoitia, por su importante ayuda técnica y científica; Gracias por haberme orientado en la tesis, por su tiempo aplicado en la corrección de la misma.

Debo agradecer también al Prof. Ramón El-Bachá del Laboratorio de Neuroquímica de la Universidad Federal de Bahía (Brasil) por haberme incitado a dar mis primeros pasos en la ciencia; estuve por casi 3 años compartiendo momentos, situaciones, haciendo amigos especiales como la no tan "famosa", Rutina "la peste", el técnico Sr. Carlos (que le falta poco para formar un equipo), la Dr. Silvia Costa y sus consejos y el Dr. Lisandro, un sinónimo de amistad y comprensión. Muchas Gracias...de veras!!!!!!

Bueno, ahora toca a los no tan importantes – "la segunda clase"... jeje es broma...Sois muy importantes y siempre lo seréis. Es obvio que algunas personas se destacan más en nuestras vidas que otras, pero eso no quiere decir que sea más o menos importante. Ha pasado mucha gente por el laboratorio, y de todos me acuerdo, salvo los que acaban de desembarcar que sinceramente me es difícil saber los nombres..jeje. Pero, hay personas que se destacan por algo, realmente algo curioso. Por acaso ¿Quién no conoce a la famosa Silviana Talipe, Silvana Talpia, Siliana..? Imposible no saberlo. Eres muy muy maja y, Silvana, lo pasé GENIAL contigo, en los buenos y malos momentos...Gracias por tus largas sesiones de conversaciones y amistad.

Bueno, bueno, hay uno que se autoproclamó el “más guapo” del Cajal. A ver quien ha sido el listillo... Como ya se te ha ido, ahora tengo yo el puesto..jeje. Gracias, Josué, por tus sesiones culturales, conversaciones y amistad. Dicen que los mejores perfumes están en las pequeñas botellas, ¿verdad? Entonces, creo que el dúo “enano” del labo, Isa y Natalia (las famosas tu1 y tu2, respectivamente), podrían incluirse en ello. Muchas gracias por vuestra amistad. Quiero también agradecer a Amayita, por su comprensión, ayuda, ingenuidad y simplicidad. Me das mucha tranquilidad cuando hablo contigo. Eres una persona increíble. ¡Gracias!

A María....ah Mary, me recuerdo como si fuera hoy de nuestros momentos en la Facultad, sea lesionando o perfudiendo los animales...lo pasé pipa contigo, y me descojono hasta hoy sólo de recordar las situaciones graciosas...¡Muchas gracias, niña!

Uff como cansa eso lo de escribir no? Es mucha gente y no tengo un espacio ilimitado, entonces, como me es imposible escribir detalladamente sobre cada uno, quiero agradecer a la gente que está, de todos me llevo algo: Yolanda; Jole, Daniela, Julia y María Ángeles, Isabel, Olguita y Paloma (gracias por vuestra ayuda), Miguel (quitando los chistes brasileños y/o portugueses, nos llevamos muy bien, jeje) y el “californiano” Veigaaaa (eres muy divertido que lo sepas jeje).

Hay mucha gente del Cajal que me ha ayudado. Muchas gracias a Carmen y Belén del Microscopio Confocal, el personal de la administración, los de servicios generales. Quiero agradecer también al personal del Hospital Niño Jesús, a Vicente Barrios, a Julie Chowen y su grupo. ¡Gracias por todo!

Por otro lado, quiero agradecer también a mis ex compis de piso, Ángel y Esteban, por haber tenido mucha paciencia al corregirme los fallos del idioma, por haberme enseñado muchas cosas...y vuestra ayuda ha sido muy importante en mi camino.

También quiero agradecerle a José...ah José...un amigo especial, siempre presente, como un hermano...Muchas Gracias por tu ayuda en los experimentos, apoyo, comprensión y amistad.

Y por último, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas más presentes en mi vida, mi padre, Carlos, y abuela, Aidil. Habéis dado la vida por mi; gracias por haberme dado alas para volar y llegar hasta donde me lleve el viento... Cualquier logro mío es vuestro más que de nadie, y por eso os he dedicado la tesis.

A mi padre, Carlos, y abuela, Aidil

Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-00272) y del Specific Targeted Research Project – Estrogens and Women Aging, Unión Europea (2005-2008).

George Emílio Sampaio Barreto ha recibido financiación del Western European Research Committee (WERC), Federation of European of Neuroscience Societies (FENS) e International Brain Research Organization (IBRO) dentro del programa WERC/FENS/IBRO PhD Fellowship (2005-2008).



ÍNDICE

RESUMEN	04
ABREVIATURAS	06
INTRODUCCIÓN	09
1- Mecanismos de acción de las hormonas sexuales en el SNC	12
1.1- Estructura y función del receptor de andrógenos	13
1.2- Estructura y función de los receptores de estrógeno	14
2- SERMs- Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno	17
2.1- Tamoxifeno	17
2.2- Raloxifeno	19
2.3- Bazedoxifeno	19
2.4- Ospemifeno	20
3- Las células gliales en el Sistema Nervioso Central	21
3.1- El astrocito en el Sistema Nervioso Central	23
3.1.1- La respuesta de los astrocitos al daño del sistema nervioso central	24
3.2- La microglía en el Sistema Nervioso Central	26
3.3- Las células NG2 en el Sistema Nervioso Central	30
3.3.1- El proteoglicano NG2	30
3.3.2- Las células NG2 en el cerebro adulto	30
4- Los andrógenos y los estrógenos regulan la glía reactiva	33
5- Modelo de Lesión Cerebral Penetrante	35
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1- Protocolos Generales	43
1.1- Animales empleados	43
2- Castración	43
2.1- Orquidectomía	43
2.2- Ovariectomía	44
3- Modelo de Lesión Penetrante	44
4- Procesamiento de los tejidos	45
4.1- Perfusión	45

5- Tinciones Inmunohistoquímicas e Histológicas.....	46
5.1- Inmunoperoxidasa.....	46
5.2- Doble inmunohistofluorescencia para BrdU y Vimentina o NG2.....	47
5.3- Doble inmunohistofluorescencia para NG2 y el receptor de estrógenos y andrógenos.....	47
5.4- Doble inmunohistofluorescencia para BrdU y MHC-II.....	48
5.5- Triple inmunohistofluorescencia para BrdU, NG2 y GFAP o vimentina.....	49
5.6- Controles de Especificidad.....	51
6- Métodos de valoración y cuantificación.....	52
6.1- Análisis morfométrico.....	52
6.2- Análisis estereológico para el recuento de astrocitos y células NG2.....	53
6.3- Estimación de la densidad de volumen para el análisis de la microglia.....	54
6.4- Doble marcaje con BrdU y Vimentina o NG2.....	55
6.5- Doble marcaje con BrdU y MHC-II.....	56
6.6- Triple marcaje con BrdU, NG2 y GFAP o vimentina.....	56
7- Análisis Estadístico de los resultados.....	57
8- Diseño Experimental.....	58
8.1- Efecto de los distintos compuestos hormonales sobre la activación y proliferación de la glía reactiva, en ratas jóvenes lesionadas.....	58
8.2- Efecto del tratamiento temprano con los SERMs, en ratas viejas lesionadas.....	63
8.3- Expresión de los receptores de estrógenos en las células precursoras de oligodendrocitos, tras lesión penetrante.....	64
8.4- Expresión y proliferación de las células NG2 y astrocitos a lo largo del tiempo después de una lesión penetrante.....	65
RESULTADOS.....	66
1- Tipos de células gliales y su distribución, tras la lesión penetrante.....	68
2- Efecto de los distintos compuestos hormonales sobre la activación y proliferación de la glía reactiva, en ratas jóvenes lesionadas.....	70
2.1- Efectos de la testosterona sobre la astrogliá y la microglía reactiva.....	70
2.2- Efectos de la testosterona sobre la proliferación de la astrogliá reactiva y la microglía reactiva.....	73
2.3- Efectos de la testosterona sobre el fenotipo y la proliferación de las células NG2.....	76
2.4- Tratamiento temprano con los SERMs y agonistas de los receptores de estrógeno.....	79
2.4.1- Efecto en la activación astrogliá.....	79
2.4.2- Efecto en la activación microglial.....	80
2.4.3- Efecto de los tratamientos sobre la proliferación glial.....	80

2.4.4- Efecto sobre el fenotipo y la proliferación de las células NG2.....	83
2.5- Tratamiento tardío con los SERMs y agonistas de los receptores de estrógenos.....	84
2.5.1- Efecto sobre los astrocitos reactivos.....	85
2.5.2- Efectos en la microglía reactiva.....	85
2.5.3- Efectos sobre las células NG2.....	88
3- Efecto del tratamiento temprano con los SERMs sobre la glía reactiva, en ratas viejas lesionadas.....	91
3.1- Efecto sobre los astrocitos reactivos.....	92
3.2- Efecto en la activación microglial.....	92
3.3- Efecto sobre las células NG2.....	93
4- Expresión de los receptores de estrógenos en las células precursoras de oligodendrocitos, tras lesión penetrante.....	97
5- Expresión y proliferación de las células NG2 y astrocitos a lo largo del tiempo después de una lesión penetrante.....	99
5.1- Expresión de las células NG2 y de la astroglia a lo largo del tiempo de lesión.....	99
5.2- Proliferación de las células NG2 y de la astroglia.....	100
DISCUSIÓN.....	104
1- La testosterona disminuye el número de astrocitos reactivos y de células de microglía reactivas, tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes: papel de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona.....	106
2- La testosterona disminuye la proliferación de astroglia y microglía tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes: papel de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona.....	110
3- La testosterona regula el número y la proliferación de células NG2 tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes: papel de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona.....	112
4- Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) regulan la gliosis tras una lesión cerebral penetrante en ratas hembra adultas jóvenes: efectos del tratamiento temprano.....	116
5- La administración tardía de los SERMs modula la expresión y proliferación de la glía reactiva, en ratas macho jóvenes lesionadas.....	118
6- Los SERMs administrados tempranamente disminuyen la glía reactiva en el cerebro lesionado de ratas viejas.....	119
CONCLUSIONES.....	122
BIBLIOGRAFIA.....	126

RESUMEN

Los andrógenos y los estrógenos modulan la supervivencia neuronal, la diferenciación glial y la expresión génica en muchas áreas del sistema nervioso durante el desarrollo. Además, estas hormonas tienen efectos protectores frente al daño neuronal causado por diversas patologías neurodegenerativas, traumáticas y tóxicas durante la vida adulta. Nuestra hipótesis es que al menos una parte de las acciones neuroprotectoras de la testosterona y el estradiol puede estar mediada por acciones sobre las células de glía, dado el papel fundamental desempeñado por estas células en la fisiopatología del sistema nervioso central. Por lo tanto, el objetivo inicial de nuestro trabajo fue determinar si la testosterona y el estradiol son capaces de regular la respuesta de los astrocitos, la microglia y las células NG2 frente a una lesión neurodegenerativa. Por otra parte, dado que las acciones hormonales periféricas de la testosterona y el estradiol limitarían su posible uso en terapias neuroprotectoras, también hemos ensayado el efecto sobre la gliosis de varios moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs), los cuales pueden actuar como agonistas de los receptores de estrógeno en el cerebro y como antagonistas de estos receptores en otros órganos del cuerpo. Finalmente, puesto que el posible uso terapéutico de los SERMs para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas podría darse en un contexto de envejecimiento, que en las mujeres está asociado al periodo de vida después de la menopausia, hemos analizado el efecto que una privación prolongada de hormonas ováricas tiene sobre la acción de los SERMs sobre la glía reactiva.

Nuestros resultados indican que la administración, temprana o tardía de la testosterona, tras una lesión penetrante en el cerebro, es capaz de disminuir el número de astrocitos reactivos, de células de microglía reactiva y de células NG2. Estos efectos de la testosterona pueden ser ejercidos mediante la regulación de la proliferación glial y estar mediados a través de su metabolito estradiol y en menor medida a través de su metabolito dihidrotestosterona. Los SERMs raloxifeno y tamoxifeno también fueron capaces de disminuir la gliosis reactiva en ratas jóvenes y viejas y su efecto parece mediado tanto por el receptor de estrógeno alfa como por el receptor de estrógeno beta. Por otra parte, nuestros datos indican que una privación hormonal prolongada de hormonas ováricas disminuye, pero no impide, la acción de diferentes SERMs sobre la gliosis. Finalmente, nuestros estudios han permitido identificar la expresión del receptor de estrógeno alfa en las células NG2, indicando que estas células, precursoras de oligodendrocitos y tal vez también de astrocitos, son

una diana directa de los compuestos estrogénicos. En resumen, nuestros resultados indican que la testosterona y el estradiol regulan la gliosis reactiva y que los SERMs pueden ofrecer interesantes perspectivas terapéuticas para controlar la inflamación cerebral tras lesiones traumáticas o neurodegenerativas.

ABREVIATURAS

ABC: Complejo Avidita-Biotina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANOVA: Análisis de Varianza
ApoE: Apolipoproteína E
APP: Proteína Precursora Amiloíde
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
BrdU: Bromodeoxyuridina
BSA: Albúmina de suero bovino
Basex: Basedoxifeno
CD1: Ciclinas D1
CD4, 8: Antígenos derivados del clon 4 y 8
Cdk4: Quinasas dependiente de ciclinas
CNP: 23-cíclico nucleotideo 3-fosfohidrolasa
CNPasa: 2'3'-nucleótido cíclico 2'-fosfodiesterasa
DHT: Dihidrotestosterona
DPN: 2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrilo
E2: Estradiol
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
ER: Receptor de estrógenos
Er α : Receptor de estrógenos alfa
Er β : Receptor de estrógenos beta
Est: Estradiol
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
GC: Guanilato Ciclasa
GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida
GGF2: Factor de Crecimiento de la Glía
GalC: Galactocerebrosideo
HCl: Ácido Clorhídrico
HMG-1: Enzima Anhidrasa Carbónica
IGF-1: Factor de Crecimiento de tipo Insulínico-1
IgG: Inmunoglobulina G
IL-1, 2, 3, 6, 8, 10: Interleuquinas 1, 2, 6, 8 o 10
IL-1 β : Interleuquina 1-beta
LPS: Lipopolisacárido
MBP: Proteína básica de mielina
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos
MHC-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
MOG: glicoproteína del oligodendrocito mielinizante
 μ m: Micras
NaCl: Cloruro Sodio
NFkB: Factor de Transcripción KAPPA B
NGS: Suero de Cabra normalizado
NG2: Proteoglicano condroitina sulfato
NO: Óxido Nítrico
OPCs: Células precursoras de oligodendrocitos
OQX: Orquidectomía
Ospem: Ospemifeno
OVX: Ovariectomía

PB: Tampón Fosfato
PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación
PDGF: Factor de crecimiento derivado de la plaqueta
PLP: Proteína proteolipídica
PPT: 4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol
Ralox: Raloxifeno
SERMs: Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SNC: Sistema Nervioso Central
T: Testosterona
Tamox: Tamoxifeno
TGF α : Factor de Crecimiento Transformante alfa
TGF β : Factor de Crecimiento Transformante beta
TNF- α : Factor de Crecimiento Tumoral alfa
Veh: Vehículo
Vim: Vimentina

Introducción

En el siglo XIX el naturalista y médico alemán Arnold Adolph Berthold (1803-1861), al estudiar el efecto de la castración y la reimplantación de los testículos en los gallos, descubrió que el cerebro era una diana directa de las hormonas sexuales (Berthold, 1849). A partir de entonces, se han descrito numerosos efectos de estas hormonas sobre el sistema nervioso central (SCN) y el sistema nervioso periférico. En el SNC ejercen diversas funciones, tales como la regulación de la expresión génica, la supervivencia neuronal, la diferenciación glial y la transmisión sináptica en muchas áreas del cerebro (García-Segura y cols., 1999; Gorski, 2002; Carrer y Cambiasso, 2002). Así, por ejemplo, la testosterona regula la plasticidad cerebral (MacLusky y cols., 2006; Garcia-Segura, 2008); previene la hiperfosforilación de la proteína Tau (Papasozomenos, 1997), que se encuentra anormalmente hiperfosforilada en la enfermedad de Alzheimer; reduce la secreción neuronal de β -amiloide (Gouras y cols., 2000), péptido que también está asociado con la enfermedad de Alzheimer y atenúa la toxicidad del β -amiloide (Pike y cols., 2008) y protege a las neuronas granulares e hilares del giro dentado de los efectos de la adrenalectomía (Frye y McCormick, 2000) y de la degeneración excitotóxica (Azcoitia y cols., 2001). Parte de estas acciones de la testosterona pueden ser el resultado de la activación del receptor de andrógenos (Hammond y cols., 2001; Jones y cols., 2001; Hajszan y cols., 2007). La testosterona también puede ejercer efectos neuroprotectores a través de su metabolito estradiol (Azcoitia y cols., 2001; Garcia-Segura, 2008). El estradiol circulante induce cambios morfológicos y funcionales en la corteza cerebral e hipocampo (Gould y cols., 1990; McEwen y cols., 1995; Woolley, 1998; Foy y cols., 1999), regula la neurogénesis hipocámpal en adultos (Ormerod y Galea, 2001; Galea y cols., 2006; Suzuki y cols., 2007) y resulta neuroprotector frente a la isquemia cerebral y en ciertos tipos de procesos neurodegenerativos (Azcoitia y cols., 1998; Wise y Dubal, 2000; Yang y cols., 2003). Por otra parte, la terapia de reemplazo hormonal, encaminada a paliar el déficit de hormonas sexuales, ha demostrado en diversos mamíferos, incluyendo al hombre, monos y otras especies, que el estrógeno puede mejorar la función cognitiva (Amin y cols., 2005; Frye y cols., 2005; Sherwin, 2005). No obstante, otros estudios señalan que estas terapias pueden tener efectos perjudiciales, como el incremento del riesgo de padecer infartos cerebrales y el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Arnal y cols., 2007). Respecto a la terapia hormonal sustitutiva (HRT = estrógenos + progestágenos) o de reemplazo con estrógenos (ERT) tras la menopausia, la mayoría de los estudios sugieren que estos tratamientos mejoran la memoria y la función cognitiva de las mujeres sanas (Wise, 2003), parecen reducir la incapacidad motora asociada a la enfermedad de Parkinson (Dluzen y Horstink, 2003; Saunders-Pullman, 2003), disminuyen el riesgo de infarto cerebral (Paganini-Hill,

2001), previenen o retrasan la aparición de la enfermedad de Alzheimer (AD) y mejoran la capacidad cognitiva de mujeres con AD (Paganini-Hill y Henderson, 1996; Asthana y cols., 2001).

Durante mucho tiempo, los sujetos principales de los estudios sobre los efectos de las hormonas sexuales en el cerebro han sido las neuronas. Sin embargo, las células de glía son también una diana de las hormonas sexuales y pueden mediar parte de los efectos de estas hormonas sobre el cerebro. Las células de glía son necesarias para la supervivencia y la función neuronal y su disfunción está implicada en numerosas patologías, mientras que la modulación de su actividad permite controlar la respuesta regenerativa del sistema nervioso. En nuestro trabajo hemos profundizado en el papel que tres de estos tipos celulares, los astrocitos, la microglía y las células NG2, juegan en las acciones de andrógenos y estrógenos en el cerebro lesionado.

A continuación repasamos los mecanismos moleculares descritos para la acción de estas hormonas, deteniéndonos en la estructura y regulación de los receptores intracelulares. Seguidamente, presentamos la función de las células gliales (astrocitos, microglía y células NG2) en el SNC normal y dañado, y el conocimiento actual de los efectos de las hormonas sexuales sobre dichas células. Finalmente, describimos el modelo de lesión utilizado en nuestro estudio, destacando la respuesta glial producida tras una lesión traumática cerebral.

1- Mecanismos de acción de las hormonas sexuales en el SNC

Debido a su naturaleza esteroide, las hormonas sexuales son capaces de entrar y salir de las células con facilidad atravesando la membranas plasmática y la envuelta nuclear. El mecanismo de acción de las hormonas sexuales pasa por la unión a un receptor intracelular. Estos receptores (receptor de andrógeno, receptores de estrógeno, receptores de progesterona) son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroides, como el receptor de la vitamina D, receptores de retinoides, de la hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos (Evans, 1988). La unión de la hormona al receptor produce en este cambios conformacionales en éste que causan la disociación de las proteínas de choque térmico, normalmente al unidad al receptor previniendo su translocación al núcleo. Una vez disociado, el receptor dimeriza y entra en el núcleo,

recluta cofactores (coactivadores, corepresores y proteínas reguladoras de la transcripción) y se une a los elementos de respuesta específicos en los promotores de determinados genes para estimular o reprimir su transcripción (Carson-Jurica y cols., 1990; McKenna y cols., 1999; McKenna y O'Malley, 2002; Onate y cols., 1995). Este modo de acción de las hormonas esteroides ha sido denominado “genómico” o de señalización iniciada en el núcleo (Falkenstein y cols., 2000). Además, las hormonas sexuales también pueden desencadenar respuestas iniciadas en la membrana plasmática. Éstas son rápidas, de unos pocos segundos a minutos y no requieren de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario. Este fenómeno de respuesta fisiológica rápida ante un esteroide fue descrito por primera vez en 1942 cuando el Dr. Hans Seyle observó en pacientes efectos anestésicos casi inmediatos, después de la administración de progesterona en pacientes. Los mecanismos de acción rápida están mediados por receptores de membrana o por los propios receptores intracelulares que se asocian transitoriamente a la membrana plasmática. Estas vías de señalización implican la activación de quinasas y la modificación de los niveles de calcio intracelular y tienen una importancia por sí mismos, además de que también pueden regular secundariamente la actividad genómica de las hormonas sexuales iniciada en el núcleo (Heinlein y Chang, 2002; Falkenstein y cols., 2000).

En los siguientes apartados, intentaremos ofrecer una visión panorámica de los conocimientos actuales sobre efectos clásicos y no clásicos de los estrógenos y los andrógenos, prestando atención a las acciones descritas en células del sistema nervioso.

1.1- Estructura y función del receptor de andrógenos

Existen dos isoformas del receptor de andrógenos, denominadas AR-A (87kDa) y AR-B (110kDa). La isoforma A es minoritaria y se debe a una traducción del mensajero AR-B a partir de la metionina-188, lo que produce una proteína con la región N-terminal truncada y que podría tener menos actividad transcripcional. La isoforma B corresponde a la secuencia codificadora completa del receptor de andrógenos (Catalano y cols., 2000; Gao y McPhaul, 1998; Wilson y McPhaul, 1994).

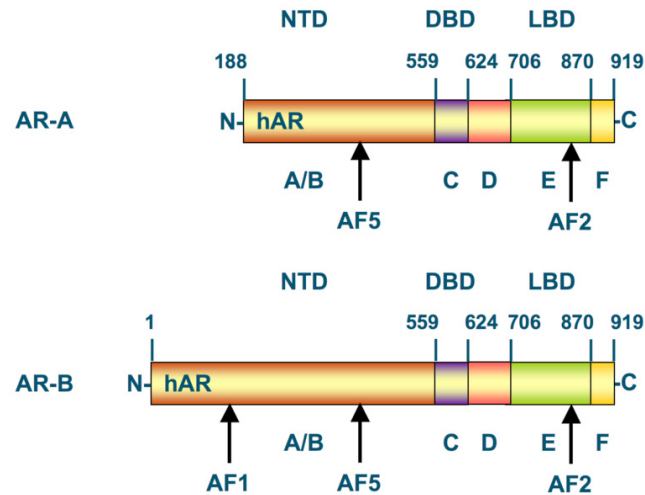


Figura 1. Estructura de las dos isoformas (AR-A y AR-B) del receptor de andrógenos humano. Los números se refieren a los residuos de aminoácidos que separan los dominios, empezando por el dominio N-terminal (izquierda) hasta el C-terminal (derecha). NTD = dominio N-terminal; DBD = dominio de unión al ADN; LBD = dominio de unión del ligando; AF = función de activación.

La regulación de la transcripción génica es el mecanismo primario de acción del receptor de andrógenos. El dímero del receptor de andrógenos se une a una secuencia específica de ADN conocida como elemento de respuesta a andrógenos (Heemers y Tindall, 2007). Recientemente se ha desvelado que el receptor de andrógenos puede tener acciones independientes de su papel como factor de transcripción (Heinlein y cols., 2002; Fix y cols., 2004), interactuando con componentes de vías de señalización iniciadas en la membrana plasmática que provocan, entre otros efectos, modificaciones en el transporte de iones. La regulación por el receptor de andrógenos de las cascadas de traducción de señales en el citoplasma puede afectar indirectamente a la actividad transcripcional a través de la fosforilación de otros factores de transcripción (Foradori y cols., 2008; Michels y Hoppe, 2008; Vasudevan y Pfaff, 2008).

1.2- Estructura y función de los receptores de estrógeno

La existencia de un receptor específico para el estrógeno fue propuesta en los años 50 por Elwood V. Jensen, quien describió la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas (Jensen, 1962; Jensen y Jordan, 2003). Algunos años más tarde, Toft y Gorski (1966) aislaron por primera vez receptores de estrógeno a partir del útero de ratas. Ambos grupos desarrollaron distintos modelos

para explicar cómo el estradiol lleva a cabo su acción al unirse a un receptor nuclear, en un momento en el que se pensaba que todos los receptores eran moléculas situadas en la membrana plasmática. Desde entonces el receptor de estrógeno ha sido ampliamente estudiado. Hasta hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo receptor, sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor que comparte gran homología con el receptor de estrógeno anteriormente conocido y se decidió denominarlos entonces receptor de estrógeno β (Kuiper y cols., 1996) al recientemente descubierto y receptor de estrógeno α al previamente conocido. En consecuencia, esto incrementó significativamente nuestro conocimiento sobre la complejidad de la fisiología de los estrógenos, sin mencionar que existen también receptores localizados en la membrana que median igualmente funciones de estas hormonas.

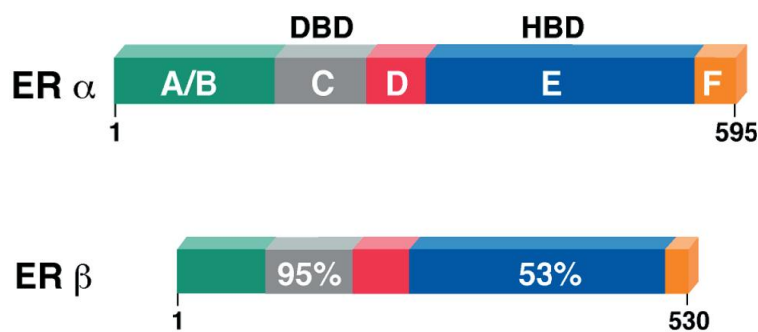


Figura 2. La estructura y los dominios del receptor alfa (ER α) y beta (ER β) de estrógeno.

Los receptores de estrógeno (Klein-Hitpass y cols., 1986; Evans, 1988; Beato y cols., 1996) pueden formar homodímeros o heterodímeros que se unen al elemento de respuesta a estrógenos. En algunos casos los receptores de estrógeno α y β tienen efectos antagónicos (Lindberg y cols., 2003). La actividad transcripcional de los receptores de estrógeno está finamente regulada, dependiendo del tejido en el que ocurre. Este control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción (Lieberman, 1997).

El estradiol también puede activar mecanismos de señalización iniciados en la membrana plasmática y ejercer efectos rápidos, regulando el flujo de iones, el desencadenamiento de potenciales de acción, la descarga de vesículas secretoras o la activación de proteínas quinasas asociadas a la membrana. Todos estos procesos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Kelly y Ronnekleiv, 2008; Prossnitz y cols., 2008; Falkenstein y cols., 2000; Nemere y Farach-Carson, 1998; Pietras y cols., 2001; Watson y Gametchu, 1999; Kelly y Levin, 2001; Levin, 1999). En 1967 Szego y

Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos, “no-genómicos”, al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) *in vivo*, pocos segundos después del tratamiento con estradiol (Szego y Davis, 1967). En 1977 Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógeno en la superficie de las células endometriales, en membranas celulares provenientes de hepatocitos (Pietras y Szego, 1977, 1979, 1980) y en células aisladas de útero de rata (Pietras y Szego, 1977). Estos autores propusieron que la unión de la hormona a la membrana podría representar una manera de transportar el estradiol en vesículas endocíticas hasta el núcleo para que ejerciera su función genómica (Pietras y Szego, 1984). Posteriormente, se comprobó en las células beta del páncreas, que el estradiol puede aumentar la concentración intracelular de Ca^{2+} inducida por glucosa y GMP cíclico (cGMP). Esto sucede pocos segundos después de estimular con estradiol y como consecuencia de la asociación del receptor de estrógeno α con la guanilato ciclasa de la membrana celular. En monocitos, la generación de una corriente de Ca^{2+} después de estimular con estradiol, induce la producción de óxido nítrico (NO) (Stefano y cols., 1999). En células endoteliales el 17- β estradiol, bien libre o conjugado con albúmina de suero bovino (estradiol-BSA), que no puede atravesar la membrana celular, estimulan la producción de cGMP y NO y activan además quinasas celulares (Chen y cols., 1999; Stefano y cols., 2000). Se han descrito también elevaciones rápidas en cAMP debidas a la acción del estradiol en células de cáncer de mama, células uterinas y músculo liso (Farhat y cols., 1996; Aronica y cols., 1994). La señalización iniciada en la membrana también participa en los mecanismos protectores de los estrógenos en el sistema cardiovascular (Ricchiuti y cols., 2008; Mendelsohn y Karas, 1999; Levin, 1999). Aquí el estradiol tiene efectos rápidos que ayudan a preservar el flujo coronario, incluyendo la estimulación de la óxido nítrico sintasa y la consecuente producción de NO y cGMP. El estradiol además inhibe los canales de Ca^{2+} en el músculo liso vascular (Nakajima y cols., 1995), reduciendo de esa manera la acción de ciertos vasoconstrictores provocando vasodilatación y mejor perfusión del corazón. También existe evidencia de la presencia de sitios de unión a membrana y de efectos agudos a estrógeno en osteoblastos y osteoclastos, que resultan en aumentos de Ca^{2+} intracelular, inositol trifosfato, diacilglicerol, cAMP, cGMP, así como la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno o MAPK (Korach, 1994; Mendelson y Karas, 1999; Stewart, 1994; Nemere y Farach-Carson, 1998; Endoh y cols., 1997). Los efectos rápidos del estradiol, en el sistema nervioso central están implicados en la protección frente a isquemia cerebral (Simpkins y cols., 1997) y en el control de la homeostasis energética (Qiu y cols., 2006) entre otras funciones.

2- SERMs- Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno

La terapia hormonal con estrógenos o con estrógenos y progesterona para el tratamiento de los síntomas asociados a la menopausia, se ha utilizado durante más de 50 años. A pesar de los beneficios que ofrece la terapia hormonal sustitutiva su uso, especialmente a largo plazo, está limitado por el posible riesgo de desarrollar cáncer de mama y útero. En consecuencia, nació la necesidad de crear drogas que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y óseo, pero sin las consecuencias negativas que ejercen sobre la mama y el útero. Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) son el objeto de muchos estudios clínicos y biológicos en el intento de buscar y descubrir nuevas vías de potenciales intervenciones terapéuticas. El entendimiento de las bases celulares y moleculares del funcionamiento de los receptores esteroideos, en este caso del receptor de estrógeno, fue lo que permitió el desarrollo del concepto de SERM. Los SERMs constituyen un grupo de compuestos naturales o sintéticos, de estructura diversa, que se unen a los receptores de estrógeno, ejerciendo una acción agonista o antagonista dependiendo del contexto celular. Actualmente los SERMs son largamente utilizados en la clínica como tratamiento primario contra el cáncer y la osteoporosis. Además, se han iniciado estudios sobre el potencial neuroprotector de estos compuestos. En nuestro estudio nos centramos en los dos SERMs más utilizados en la actualidad, el raloxifeno y el tamoxifeno. También hemos analizado el efecto de otros dos SERMs de nueva generación, bazedoxifeno y ospemifeno, cuyo efecto sobre el sistema nervioso es aún desconocido.

2.1- Tamoxifeno

El tamoxifeno es utilizado actualmente como tratamiento hormonal del cáncer de mama y es el SERM más conocido y estudiado. Fue descubierto hace 40 años en un momento en que aún no se conocía la posibilidad de que algún agente químico o droga, pudiera tener una función estrogénica en un tejido y antiestrogénica en otro. El concepto de SERM no existía, ya que todavía no habían sido definidas las bases moleculares de acción de los receptores esteroideos. El tamoxifeno, al igual que la mayoría de los SERMs, ejerce su acción primariamente al competir con el estradiol en la unión a los receptores de estrógeno y alterar su conformación. *In vitro*, el tamoxifeno

causa estancamiento en la fase G1 del ciclo celular de células de cáncer de mama que expresan receptores de estrógeno (Sutherland y cols., 1983) y disminuye los niveles de la ciclina D1 (Watts y cols., 1994). También, disminuye la expresión del factor de crecimiento tumoral alfa (TGF- α) y aumenta la expresión de TGF- β 1 y TGF- β 2 (Salomon y cols., 1989). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, el tamoxifeno inhibe la fosforilación del receptor de crecimiento del factor semejante a la insulina IGF-I (Guvakova y Surmacz, 1997), pero en una línea celular endometrial produce el efecto contrario, es decir, induce la fosforilación del receptor, actuando de manera similar al estrógeno (Kleinmsn y cols., 1996). *In vivo*, inhibe el crecimiento de tumores de células MCF-7 implantadas en ratones y previene el desarrollo de tumores mamarios experimentales en ratones (Jordan, 1976; Gottardis y Jordan, 1987). Al igual que el estradiol, estimula la síntesis de IGF-I y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el útero (Huynh y Pollak, 1993; Hyder y cols., 1996).

El uso clínico del tamoxifeno ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de tumores de mama que expresan receptores de estrógeno (aproximadamente el 60-70% de los tumores en el momento del diagnóstico) y si es administrado durante 5 años consecutivos previene la aparición de recurrencia del cáncer en un 42%. Además esta droga fue aprobada recientemente para la prevención primaria de la aparición de cáncer de mama. En estudios clínicos se ha demostrado que la administración de 20 mg de tamoxifeno al día reduce la incidencia de cáncer de mama entre el 49% y el 55%. Entre los efectos secundarios del tamoxifeno, al que más importancia se le ha dado es al del aumento de la incidencia de cáncer de endometrio, debido a que funciona como agonista del estradiol en el útero (Fisher y cols., 1999). Otros posibles efectos secundarios indeseados incluyen los sofocos y la aparición de pólipos endometriales, quistes y procesos tromboembólicos. No obstante, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (perteneciente a la OMS) recomendó que las mujeres que reciben tamoxifeno, no deben parar su tratamiento por estos efectos secundarios, ya que los beneficios que esta droga ofrece (disminución significativa en la mortandad debida al cáncer de mama) son mucho mayores que el riesgo a desarrollar cáncer de endometrio. Por esta razón, esta droga ha sido utilizada con éxito, en el tratamiento del cáncer de mama, durante más de 20 años.

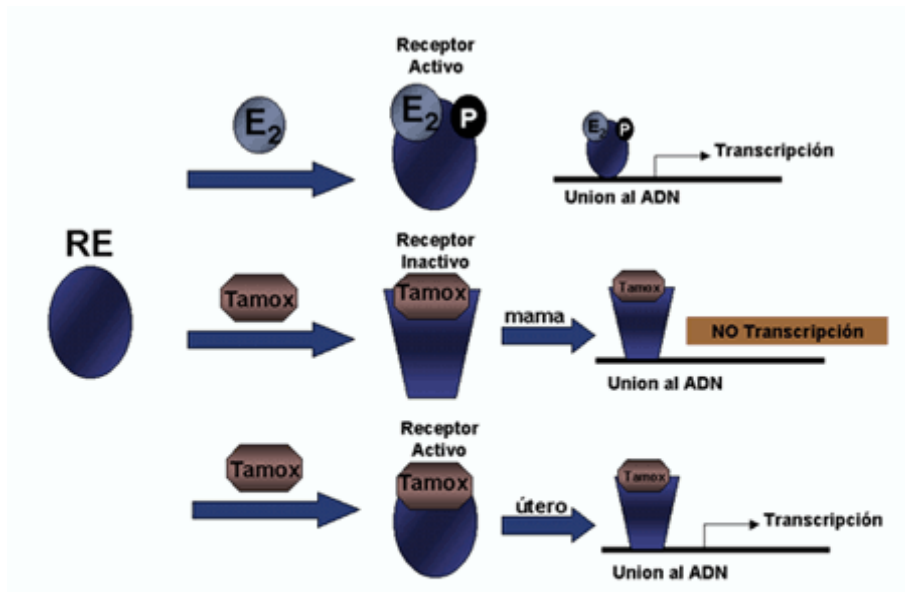


Figura 3. Mecanismo de acción del Tamoxifeno. La unión del estradiol (E_2) al receptor de estrógeno (RE) causa la activación de receptor y la consecuente inducción de la transcripción. Usualmente, los SERMs, en este caso el tamoxifeno (Tamox), actúan compitiendo con el estradiol e induciendo un cambio conformacional en el receptor, que dependiendo del tejido, hace que el tamoxifeno actúe como agonista o como antagonista estrogénico.

2.2- Raloxifeno

El raloxifeno comenzó a ser estudiado cuando se descubrieron los efectos no deseados del tamoxifeno y surgió la necesidad de utilizar otros SERMs que no tuvieran estos efectos negativos. El raloxifeno fue aprobado hace unos pocos años para el tratamiento de la osteoporosis, por el efecto que ejerce en el mantenimiento de la densidad ósea en mujeres posmenopáusicas (Pelayo y cols., 2008; Jochems y cols., 2007). Esta droga también tiene efecto antiestrogénico en la mama, pero sin el efecto estrogénico sobre el útero. Igual que el tamoxifeno, el raloxifeno disminuye la síntesis de LDL, sin afectar la de HDL y no tiene efectos negativos sobre la mama (Dayspring y cols., 2006; Francucci y cols., 2005).

2.3- Bazedoxifeno

El bazedoxifeno es un SERM de tercera generación que actúa como agonista de los receptores de estrógeno en el hueso y el sistema cardiovascular y como un

antagonista de los receptores de estrógeno en la mama y el útero (Hyder y cols., 1996).

2.4- Ospemifeno

El ospemifeno es un metabolito del trifeniletileno, otro SERM muy parecido estructuralmente al tamoxifeno. Está actualmente en desarrollo para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama y la osteoporosis (Guvakova y Surmacz, 1997; Kleinman y cols., 1996). Se encuentra en tests clínicos para comprobar su eficacia en un total de 3 investigaciones clínicas (dos en la fase I y una en la fase II). El ospemifeno ejerce una acción positiva en el sistema óseo de mujeres postmenopáusicas. Además, disminuye los niveles de colesterol LDL y tiene un efecto semejante al del raloxifeno en el endometrio.

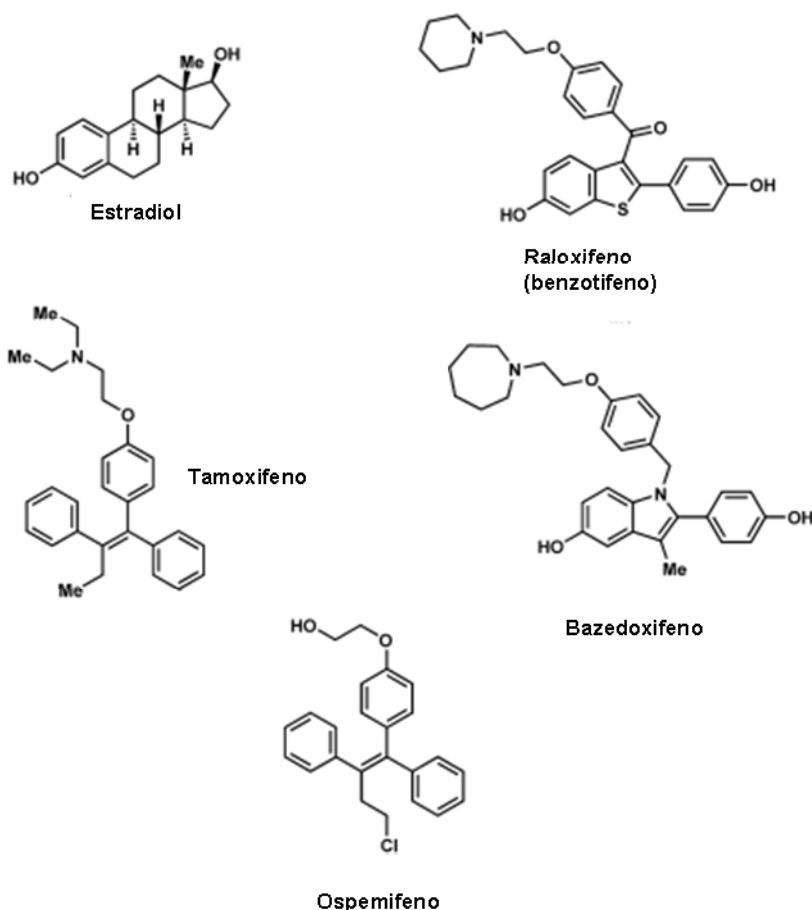


Figura 4. Figura representativa de la estructura molecular del estradiol y de los diferentes SERMs (Raloxifeno, Tamoxifeno, Bazedoxifeno y Ospemifeno) utilizados en nuestros estudios.

3- Las células gliales en el Sistema Nervioso Central

La existencia de las células gliales o glía fue descrita por primera vez en 1856, cuando Rudolph Virchow reconoció la presencia de un componente intersticial o tejido conjuntivo en el sistema nervioso envolviendo los componentes neuronales y que denominó *Nervenkitt* o neuroglía. En 1865 Otto Deiters fue el primero en identificar células no neuronales en la sustancia blanca. Con Camillo Golgi se inició el estudio detallado de la morfología de las células gliales, puesto que su técnica de impregnación argéntica (1885-1886) permitió identificar morfológicamente de manera fiable los distintos tipos celulares del sistema nervioso de los vertebrados. Describió las células gliales como conjuntivas aracnoides o estrelladas sin prolongación nerviosa. En 1893 Michael van Lenhossek introdujo el término de astrocito para hablar de las células de la neuroglía de forma estrellada. También en 1893 William Lloyd Adriezen clasificó la glía en fibrosa, principalmente presente en la sustancia blanca y, protoplasmática, principalmente en la sustancia gris. La glía fibrosa estaba constituida por células estrelladas, con prolongaciones largas, delgadas y poco ramificadas. La glía protoplasmática estaba constituida por células con numerosas prolongaciones en todas direcciones, cortas y ramificadas. Santiago Ramón y Cajal atribuyó el nombre de astrocitos a estos dos tipos de glías y más tarde describió la presencia de un tercer elemento celular en el SNC (1913), además de los astrocitos y las neuronas. En 1921 Pío del Río-Hortega, discípulo de Cajal, descubrió que el 'tercer elemento' celular del SNC estaba compuesto por dos tipos diferentes de células: la microglía (células de Hortega) y los oligodendrocitos a los que inicialmente denominó como glía interfascicular. Paralelamente, Wilder Penfiel (1924) presentó un estudio sobre la oligodendroglía. A principios del siglo XX quedaron pues definidos los tres tipos principales de células gliales en el SNC: astrocitos, microglía y oligodendrocitos (Fig. 4). La proporción relativa de cada uno de estos tipos celulares varía con la especie, la región cerebral e incluso con la edad (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

Durante mucho tiempo las células gliales han sido consideradas un simple soporte de la estructura del tejido nervioso; hoy en día, el concepto sobre sus funciones en el cerebro ha cambiado y se les atribuye una participación más activa en la modulación y transmisión de la señales nerviosas (Kirchhoff y cols, 2001; Perea y Araque, 2005, 2006, 2007).

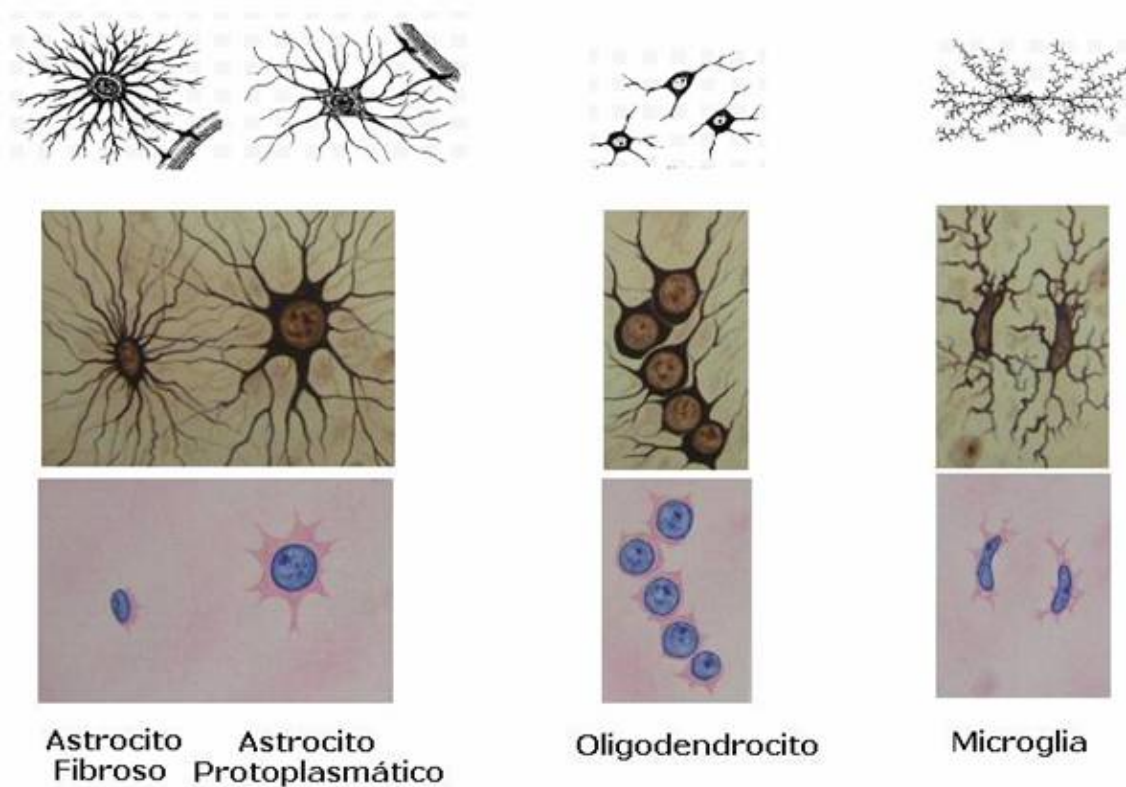


Figura 5. Principales tipos gliales del SNC humano (Imagen adaptada del Texto y Atlas de Anatomía Prometheus, volumen 3).

Durante el desarrollo embrionario, la glía radial es precursora de las neuronas y dirige su migración. En el organismo adulto, los oligodendrocitos sintetizan y mantienen las vainas de mielina que recubren los axones, facilitando la rapidez de la propagación del impulso nervioso; la microglía constituye el sistema inmune del cerebro por su capacidad de respuesta ante la invasión de microorganismos y la eliminación de los restos celulares y la astrogía proporciona el soporte nutricional y trófico a las neuronas vecinas, modulando su actividad sináptica regulando los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores y mediante la liberación de gliotransmisores (Perea y Araque 2006, 2007; Theodosis y cols., 2008; Nave y Trapp, 2008; Noctor y cols., 2007; Kielian, 2008). En condiciones fisiológicas, las células gliales desempeñan funciones tales como la producción de factores neurotróficos, la regulación de la homeostasis del entorno neuronal, el mantenimiento de la capacidad de señalización de las células nerviosas y la regulación de las sinapsis. Ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión traumática, neurodegeneración e incluso envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y

estereotípica, acompañados por la producción de citocinas pro-inflamatorias, lo que se denomina como “gliosis reactiva o glía activada” (Raivich y cols, 1999). Pero no toda la glía responde de la misma manera cuando se produce un daño neuronal. En este sentido, se ha de señalar que generalmente los oligodendrocitos no muestran cambios reactivos después de lesiones en el SNC y que, al igual que las neuronas, son más susceptibles cuando el daño es sostenido. Por lo tanto, la astroglia y la microglía son las dos mayores poblaciones de células gliales reactivas (Streit y cols, 1999), seguidas en esa orden por las células NG2 (Levine y cols., 2001).

3.1- El astrocito en el Sistema Nervioso Central

Las células del linaje astrocitario aparecen durante las etapas más tempranas de la histogénesis del SNC, atravesando una fase bipolar y otra monopolar, para finalmente transformarse en astrocitos maduros y multipolares (Mission y cols, 1991; Steindler y Laywell, 2003; Morest y Silver, 2003).

En el cerebro, la visión clásica de los astrocitos como “células al servicio de otras células” ha provocado que se les asignaran funciones auxiliares de las neuronas, o propiedades entendidas en relación con la función neuronal. Estas funciones, tales como el mantenimiento del equilibrio iónico y el pH extracelular, la aportación de glucosa y sustratos metabólicos, la retirada de productos de desecho del metabolismo y la neurotransmisión, las realiza, efectivamente, el astrocito. Sin embargo, se han ido destapando más funciones astrocitarias, algunas controvertidas, que podrían cambiar o corregir algunas visiones extendidas sobre el funcionamiento del sistema nervioso. Así, los astrocitos determinan la arquitectura del SNC (Bushong y cols., 2002, 2004), responden a señales neuronales aumentando sus niveles de calcio intracelular (Ding y cols., 2007) y liberan señales que regulan la fuerza y la función de las sinapsis (Araque y cols., 1998, 2002; Newman, 2003), modulando la actividad sináptica (Perea y Araque, 2005, 2006, 2007). También controlan la función vascular y la acoplan a la actividad neuronal (Abbot, 2002; Zonta y cols., 2003; Anderson y Nedergaard, 2003) e incluso pueden ser precursores y reguladores del recambio neuronal en el cerebro adulto (Hong y cols., 2008; Magnus y cols., 2007; Ganat y cols., 2006; Alvarez-Buylla y Lim, 2004). Además, el astrocito contiene la mayor reserva de energía del cerebro de los mamíferos, en forma de glucógeno (Dringen y cols., 1993), que puede ser una fuente de energía rápidamente disponible por las neuronas cuando hay carencia de glucosa (Wender y cols., 2000). Por otro lado, la capacidad de formación de redes astrocitarias basadas en las uniones comunicantes (“gap”) es esencial para el

transporte de sustancias, permitiendo el soporte trófico, aporte de sustratos neuroprotectores, y la retirada de toxinas y productos de la neurotransmisión del espacio extracelular (Eddleston y Mucke, 1993; Medina y cols., 1999; Takuma y cols., 2004).

3.1.1- La respuesta de los astrocitos al daño del sistema nervioso central

La activación astrogliar es un evento común a numerosas lesiones o patologías del sistema nervioso (Sandhir y cols., 2008; Ankeny y cols., 2008; Mori y cols., 2008; Farfara y cols., 2008; Gao y cols., 2008; Cordeau y cols., 2008; Nadler y cols., 2008; Holmberg y cols., 2008; Suma y cols., 2008; Byrnes y cols., 2007). La respuesta astrogliar a las lesiones ocurre rápidamente, y se puede detectar tan pronto como una hora después de un trauma mecánico (Mucke y cols., 1991). La primera célula en activarse después de cualquier lesión, sin embargo, es la microglia, que secreta diversos factores responsables de la activación astrogliar (Davis y cols., 1994; Kreutzberg, 1996; Streit y cols., 1999; Liberto y cols., 2004). La activación astrocitaria incluye la proliferación celular, pero no en todos los casos es así.

Los eventos más característicos son la hipertrofia, la proliferación astrocitaria y la sobreexpresión de filamentos intermedios, como se observa en la figura 6 (Norton y cols., 1992; Amat y cols., 1996; Silver y Miller, 2004). Esto está acompañado por un aumento en la expresión de una variedad de moléculas que incluyen factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas, eicosanoides, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en diferentes funciones (Eddleston y Mucke, 1993; Ridet y cols., 1997).

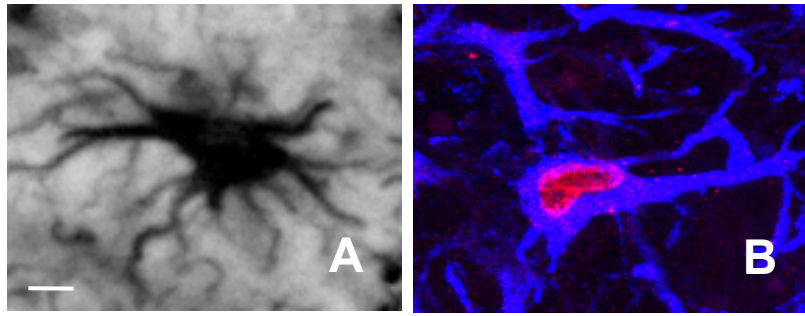


Figura 6. Ejemplo representativo de astrocitos reactivos en el cerebro de rata. (A) Inmunohistoquímica contra vimentina que muestra un astrocito reactivo, con prolongaciones hipertróficas, en respuesta a una lesión penetrante. (B) Inmunohistoquímica contra BrdU (rojo, marcador de proliferación) y Vimentina (azul) que muestra la proliferación astrocitaria frente a una lesión traumática cerebral. Escala, 10 μ m.

El fenotipo astrocitario reactivo difiere en función del tipo de lesión del SNC. En las lesiones anisomórficas, que alteran la morfología tisular y rompen físicamente la barrera hematoencefálica, se produce la gliosis anisomórfica o anisotrópica, en la que las fibras astrogliales tienden a asumir una orientación irregular para rellenar las cavidades producidas por el trauma. Este tipo de gliosis incluye hipertrofia celular, proliferación, extensión de prolongaciones y un aumento en la síntesis de proteínas de filamentos intermedios, como la GFAP, la vimentina o la nestina, que concluye con la formación de un borde compacto de glía limitante, conocido como cicatriz glial (Norton y cols., 1992; Ridet y cols., 1997; Fawcett y Asher, 1999, 2006). Un segundo tipo de gliosis respondería a las lesiones isomórficas en las que no se altera la morfología del tejido y también ocurre en regiones alejadas del foco primario de una lesión anisomórfica. En la gliosis isomórfica los astrocitos se hipertrofian y pueden proliferar, pero no forman cicatriz y mimetizan la arquitectura normal del tejido nervioso (Bovolenta y cols., 1992; Finsen y cols., 1993; Raivich y cols., 1999).

Los astrocitos reactivos ejercen efectos neuroprotectores pero también pueden exacerbar el daño, por lo que la inhibición de la gliosis puede llegar a ser neuro protectora (Mourlevat y cols., 2003). Por un lado los astrocitos median la reparación celular a través de la secreción de factores neurotróficos (Sasaki y cols., 2004; Dougherty y cols., 2000), la expresión del factor de crecimiento nervioso y GDNF (Chen y cols., 2006). Los astrocitos pueden también minimizar el daño y muerte neuronal a través de la manutención de los niveles homeostáticos de neurotransmisores (Newman y cols., 2003). Además, estas células protegen a las

neuronas a través de la regulación de la síntesis y uso de factores metabólicos (Magistretti, 2006). Después de lesiones traumáticas, los astrocitos reactivos disminuyen el daño tisular controlando y restaurando la integridad de la barrera hematoencefálica, evitando la extensión de edemas vasogénicos y citotóxicos mediante transportadores de iones y aquaporinas (Chen y Swanson, 2003). Pero por otra parte, la cicatriz glial supone un grave impedimento para la regeneración axonal ya que forma una barrera física que impide el crecimiento de las neuritas (Bovolenta y cols., 2002; Le Roux y Reh, 1996; Fawcett y cols., 2006). Además, en la matriz extracelular de la cicatriz glial se acumulan numerosas moléculas que inhiben la regeneración axonal (Fawcett y Asher, 1999; Hampton y cols., 2006; Silver y Miller, 2004) y se ha demostrado que la inhibición de la astrogliosis estimula la regeneración axonal y el crecimiento de neuritas, no solo por la ausencia de un impedimento físico sino también por la falta de secreción de dichas moléculas inhibitorias del crecimiento axonal (Fawcett y Asher, 1999; Gates y Dunnett, 2001; Silver y Miller, 2004; Sandvig y cols., 2004). En co-cultivos de neuronas y astrocitos, la inhibición de la gliosis provoca una mayor supervivencia neuronal, un aumento en la extensión de las neuritas y una mayor longitud de las mismas (Menet y cols., 2001). *In vivo*, la inhibición de la gliosis astrocitaria permite una recuperación motora en las ratas con hemisección medular, aunque no por regeneración de larga distancia (Menet y cols., 2004). La disrupción de la cicatriz glial también permite una mejor integración anatómica y funcional de nuevas neuronas en el tejido nervioso, a partir de trasplantes neuronales (Kinouchi y cols., 2003).

3.2- La microglía en el Sistema Nervioso Central

Como se ha mencionado antes, las células de microglía fueron descritas por primera vez a comienzos del siglo XX por Pío del Río-Hortega. En 1919 Del Río-Hortega había desarrollado una tinción con carbonato de plata, que permitió distinguir la microglía de las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, en cortes de cerebro de mamíferos. A partir de entonces se dedicó durante más de un decenio a profundizar en la naturaleza de tales células, averiguando que la microglía aparecía en forma de cuerpos amorfos en el cerebro en desarrollo y luego se diferenciaban en formas muy ramificadas que colonizaban todas las regiones del cerebro. Además, cuando el cerebro sufría una grave lesión, respondían de manera espectacular. También observó que, en la reacción ante una herida incisiva, las células ramificadas retraían sus finas

protuberancias para retornar a su conformación inmadura, redondeada. De esta manera, Del Río-Hortega se dio cuenta de que en esta última etapa, la microglía se asemejaba a los macrófagos. Además, observó que cuando las células de microglía percibían que algo estaba atacando al tejido o sufría una infección, éstas emigraban a las áreas afectadas, proliferaban y se hacían muy fagocíticas, es decir, se convertían en eliminadoras de detritus, capaces de engullir y degradar microbios, células moribundas y otros materiales de desecho. Como consecuencia, hacia 1932 avanzó la idea de que la adopción de la forma redondeada de la microglía reflejaba una metamorfosis hacia el estado fagocítico, cumpliendo la misma función que los macrófagos del sistema inmunitario. En los años ochenta el grupo de V. Hugh Perry demostró que la microglía cerebral podía ser identificada mediante el uso de varios anticuerpos monoclonales (Perry y Gordon, 1988; Perry y cols., 1985). A esta importante aportación se le sumó la llegada por entonces de métodos para mantener poblaciones puras de microglía en placas de cultivo, con lo que ya se podía examinar la actividad de estas células. Cabe destacar que el descubrimiento de Perry fue muy relevante porque además de “teñir” la microglía, respaldaba la hipótesis de la función de ésta en la defensa inmunitaria del SNC, ya que varios anticuerpos que reconocen proteínas que sólo se expresan en células del sistema inmunitario encontraron también su diana en la microglía. Más aún, algunos de los anticuerpos demostraban que las células se comportaban como macrófagos, los cuales son presentadores de antígenos, ya que fragmentan proteínas fabricadas por los microorganismos invasores y exponen sus fragmentos en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Esta exposición provoca el ataque por parte de las células inmunitarias adicionales. Así, entre 1985 y 1989, se comprobó que los anticuerpos monoclonales capaces de reconocer a las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, solían unirse a la microglía (Perry y Gordon, 1988; Akiyama y cols., 1988; Steiniger y Van der Meide, 1988; Suzumura y cols., 1987). Semejante conducta revelaba que, contra la opinión dominante, la microglía producía moléculas de histocompatibilidad de clase II.

Durante el desarrollo, la microglía es la responsable de la remoción de las células muertas (Ashwell, 1990; Ellison y de Vellis, 1995) y de los axones sobrantes (Innocenti y cols., 1983), pero también participa en la regulación de la glicogénesis (Giulian y cols., 1988). Las funciones básicas de la microglía en el cerebro adulto en condiciones fisiológicas, son la vigilancia inmunitaria y la inspección y control del medio extracelular. Las situaciones de infección o daño tisular provocan la inducción de una respuesta inflamatoria en la microglía, que es capaz de presentar antígenos

(Becher y cols., 2000; Aloisi, 2001). La activación microglial puede iniciarse por la presencia de niveles alterados de potasio, purinas o pirimidinas, que son señalizadores del daño neuronal (Khanna y cols., 2001; Inoue, 2002). También pueden servir como factores activadores de la microglía ciertas proteínas que normalmente no se encuentran en el compartimiento extracelular del SNC, o que se expresan en niveles relativamente moderados, como la trombina, fragmentos del complemento, proteínas de choque térmico, citoquinas, proteína beta amilácea, gangliosidos o quimioquinas (Klein y cols., 1997; Moller y cols., 1997, 2000).

En el cerebro adulto, la microglía en reposo presenta un fenotipo ramificado, aunque con algunas variaciones regionales y diferencias entre distintas especies (del Río-Hortega, 1919, 1920, Lawson y cols., 1990). En respuesta a diversos estímulos lesivos, la microglía adopta morfologías distintas: una morfología hipertrofiada, típica de los primeros estadios tras la lesión (figura 7A), una morfología en bastón, al disponerse longitudinalmente sobre las dendritas en degeneración; una morfología arbustiva, que aparece, por ejemplo, en zonas con degeneración de terminales y rebrote axonal (“sprouting”); una morfología ameboide, en lesiones con ruptura del parénquima y degeneración celular, o agrupaciones de microglía o microglia/macrófagos, con una alta actividad fagocítica, en torno a células muertas (Jorgensen y cols., 1993; Finsen y cols., 1993; Kreutzberg, 1996; Jensen y cols., 1997). Los diversos grados de activación microglial conllevan un aumento de la expresión de marcadores como antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I, MHC-II) y moléculas co-estimuladoras (B7-1), TNF- α , varias moléculas de adhesión celular como la trombospondina, TGF- β , e incluso la expresión *de novo* de la proteína precursora amilácea (APP) (Kreutzberg, 1996). Además, la microglía puede proliferar intensamente tras una lesión traumática cerebral (Figura 7B; Simard y Rivest, 2007).

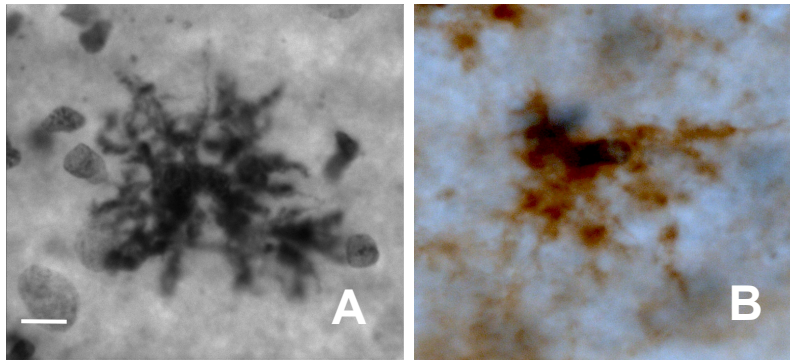


Figura 7. Ejemplos de células de microglía reactiva en el cerebro de rata. (A) Inmunohistoquímica contra MHC-II que muestra una célula de microglía reactiva en respuesta a una lesión penetrante. (B) Inmunohistoquímica contra BrdU (azul, marcador de proliferación) y MHC-II (marrón) que muestra la proliferación microglial a frente una lesión penetrante. Escala, $10\mu\text{m}$.

La microglía activada puede ejercer una acción neuroprotectora (Polazzi y cols., 2001; Polazzi y Contestabile, 2002) mediante la secreción de productos que son beneficiosos para la función neuronal, como el IGF-1 (Zhao y cols., 2006; Mason y cols., 2001), la tromboespondina (Chamak y cols., 1994), el bFGF y el NGF (Heumann y cols., 1987), la interleuquina 1 (Wang y cols., 2008; Lai y Todd, 2008) o 6 (Juliet y cols., 2008; Sawada y cols., 1995; Bruce-Keller, 1999), el $\text{TNF-}\alpha$ (Cheng y cols., 1994) o diversos prostanoídes (Minghetti y Levi, 1998). Además, la microglía activada parece necesaria para la remodelación del tejido nervioso dañado (Prewitt y cols., 1997; Moller y cols., 2000). Su capacidad fagocítica le permite retirar los restos celulares y la mielina, inhibidora del crecimiento axonal (Cadelli y cols., 1992; Frisen y cols., 1994). También puede mediar la muerte de oligodendrocitos inhibidores de la regeneración (Lotan y cols., 1994). No obstante, aunque la respuesta de activación aguda de la microglía tiene un carácter protector, el efecto de estas células puede ser nocivo en los casos de activación crónica, debido a deficiencias en los mecanismos que las mantienen en niveles de activación controlados (Akiyama y cols., 2000; McGeer y McGeer, 2001) o como consecuencia de un defecto genético, una infección vírica o priónica o por el desgaste producido por el envejecimiento (Strei, 2002; Streit y cols., 2004). En estas condiciones, la microglía puede producir mediadores citotóxicos, como el glutamato en gran concentración e especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno (Yawata y cols., 2008; Nakajima y cols., 2007; Giulian y cols., 1990, 1995; Banati y cols., 1993).

3.3- Las células NG2 en el Sistema Nervioso Central

3.3.1- El proteoglicano NG2

El proteoglicano de membrana NG2 fue primeramente caracterizado en ratas como una molécula de alto peso molecular (Stallcup, 1981; Nishiyama y cols., 1991; Levine y Nishiyama, 1996). Posteriormente, se reconoció su presencia en el hombre como un proteoglicano sulfatado del melanoma (MCSP; Pluschke y cols., 1996). Además, ha sido independientemente redescubierto como la molécula AN2 en ratones (Niehaus y cols., 1999; Schneider y cols., 2001). Algunos homólogos del proteoglicano NG2 existen en *Drosophila* (CG10275) y en *Caenorhabditis elegans* (C48E7.6.p.).

El proteoglicano NG2 se expresa en células inmaduras, como el cartílago en desarrollo, células musculares lisas inmaduras, mioblastos esqueléticos, células-madre epidérmicas y melanomas humanos (Stallcup, 2002; Nishiyama y cols., 2005). En el SNC, el proteoglicano NG2 es un marcador de oligodendrocitos inmaduros *in vitro* (Levine y Nishiyama, 1996), superponiéndose parcialmente con O4 y la 2',3'-cíclico nucleótido 3'-fosfodiesterasa (CNPase), desapareciendo en las células que expresan marcadores tardíos del desarrollo, tales como la glicoproteína asociada a la membrana (MAG) y la glicoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG). El análisis con la técnica de Western blot de homogenizados cerebrales, utilizando el anticuerpo monoclonal AN2, que reconoce la NG2 en ratones, han desvelado que la expresión de dicha proteína se inicia en el día E13/E14 embrionario, con picos de expresión postnatal en el día P8-P12 y gradualmente disminuye con el tiempo de desarrollo (Niehaus y cols., 1999). La expresión de NG2, sin embargo, no está limitada sólo a las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) y pericitos, durante el desarrollo del sistema nervioso central. En el sistema nervioso periférico, las células inmaduras de Schwann (Schneider y cols., 2001) y células similares a los fibroblastos (Morgenstern y cols., 2003) también expresan NG2.

3.3.2- Las células NG2 en el cerebro adulto

Un número significativo de células mantiene la expresión de NG2 en el cerebro adulto después de que la gliogénesis esté completa. Estas células tienen dos morfologías distintas: la primera morfología se asemeja a un astrocito protoplásmico que contiene un núcleo oblongo y un citoplasma de pequeño tamaño con

prolongaciones bipolares o unipolares. La segunda morfología se asemeja a una célula de microglía o a un oligodendrocito premielinizante con prolongaciones radiadas multipolares (Horner y cols., 2002). Su papel en la función del cerebro del adulto en condiciones fisiológicas y el significado de su activación en estados de lesión o de reparación todavía no están bien definidos. Hay evidencia de que una subpoblación de células NG2 desempeña un papel de progenitor en el SNC adulto por lo cual continúan dividiéndose, y eso retiene la expresión del receptor para PDGF. Estas células adultas exhiben claras diferencias con las células embrionarias, en la migración, la duración del ciclo celular y la restricción del linaje. Las células tienen el fenotípico antigénico de las células precursoras de oligodendrocitos, pero el fenotípico morfológico y distribución de los astrocitos. Estas células son antigénicamente distintas, sin embargo, de los astrocitos, la microglía, los oligodendrocitos productores de mielina y las neuronas. La visión actual es que algunas de estas células NG2 son progenitores de oligodendrocitos. Las células NG2 constituyen una población altamente compleja y distinta de la población glial adulta dentro del SNC y son consideradas como el cuarto tipo de célula glial en el sistema nervioso adulto. El análisis por microscopía electrónica revela que estas células son claramente distintas de cualquier otro tipo de célula en el sistema nervioso adulto (Butt y cols., 2002).

Las células NG2 establecen contactos con los astrocitos que expresan la GFAP y también con los nodos de Ranvier en la sustancia blanca (Butt y cols., 2002). Además, las células de NG2 mantienen una relación estrecha con las neuronas, incluyendo el contacto de sus prolongaciones con las estructuras sinápticas (Ong y Levine, 1999; Butt y cols., 2002). Los contactos de las células NG2 con los nodos de Ranvier y sinapsis sugieren que estas células son capaces de modular la actividad neuronal (Ong y Levine, 1999; Butt y cols., 1999; Bergles y cols., 2000). Se ha demostrado que las prolongaciones de las células NG2 en el hipocampo en desarrollo y adulto expresan los receptores de AMPAR y GABA_A y forman contactos con las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas (Bergles y cols., 2000; Lin y Bergles, 2004a, b). La activación neuronal produce la liberación de glutamato y GABA y la activación de los receptores AMPAR y GABA_A, respectivamente, en las células NG2. Estas células establecen contactos con los astrocitos y pueden tener áreas densas que parezcan sinapsis, en los puntos de contacto con los axones (Peters, 2004). Además, el proteoglicano NG2 podría estar implicado en el reconocimiento y señalización entre neuronas y glía (Stegmuller y cols., 2003) y desempeñar un papel en la modulación de la actividad sináptica.

Varios estudios se han centrado en la investigación del papel funcional y morfológico de las células NG2, en condiciones de daño cerebral (Buffo y cols., 2008; Laabs y cols., 2007; Hampton y cols., 2007; Massey y cols., 2008; Wigley y cols., 2007; Wang y cols., 2007; Rola y cols., 2006; Magnus y cols., 2008; Paintlia y cols., 2008; Rhodes y cols., 2006; Yokoyama y cols., 2006; Tatsumi y cols., 2006). Su respuesta al daño incluye cambios acusados en la morfología celular, junto con un aumento de la inmunorreactividad a NG2 y, en algunos casos, proliferación celular (Figura 8A, B). Estas respuestas se han observado después de una lesión penetrante en el cerebro (Levine, 1994), tras una infección viral (Levine y cols., 1998; Redwine y Armstrong, 1998), frente a la toxicidad del kainato (Ong y Levine, 1999), y frente a la inflamación como la que se produce en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (Nishiyama y cols., 1997). En muchos casos son las primeras células a reaccionar al daño, pero, a diferencia de la microglia, estos cambios reactivos están limitados espacialmente al área que bordea la lesión (Levine, 1994; Levine y Reynolds, 1999; Cenci di Bello y cols., 1999). En efecto, las células NG2 son un componente de la cicatriz glial y se acumulan en los sitios de lesión. Así, las cicatrices gliales que se forman tras hemisecciones de la médula espinal (Jones y cols., 2002) y tras lesiones perforantes en la corteza cerebral (Hampton y cols., 2004) contienen una alta densidad de células NG2. Dentro de las primeras 48 h después de una lesión cerebral, se observan a lo largo del borde de la herida, células de forma irregular con densos depósitos de material inmunorreactivo para NG2 en sus superficies. Muchas de estas células incorporan ³H-timidina y a lo largo del periodo comprendido entre los días 3º y 5º tras la lesión, hay un aumento progresivo del número de células NG2, alcanzándose los máximos niveles de estas células en la cicatriz glial entre los días 7º y 10º post-lesión (Levine, 1994).

El significado funcional de la respuesta de las células NG2 a la lesión no está bien establecido. Es posible que los niveles altos de proteoglicanos, incluyendo el NG2, puedan tener un efecto neuroprotector. Sin embargo, las células NG2 en la zona lesionada, están directamente implicadas en la inhibición neuronal tras la lesión (Tan y cols., 2005) puesto que se ha demostrado que el proteoglicano NG2 es secretado en las zonas dañadas e inhibe el crecimiento axonal (Chen y cols., 2002; Dou y Levine, 1994). Por otra parte, en lesiones desmielinizantes, las células NG2 proliferan y tienen potencial remielinizante (Gensert y Goldman, 1997), produciéndose un aumento en el número de estas células alrededor de estas lesiones. Este incremento en el número de células NG2 es seguido de una disminución semanas después, cuando aparecen los oligodendrocitos y se remielinizan las lesiones (Keirstead y cols., 1998; Watanabe

y cols., 2002). En experimentos en los que se administró BrdU para marcar las células NG2 en proliferación en las lesiones desmielinizantes se observó que muchos de los oligodendrocitos generados durante el proceso de remielinización, eran positivos para la BrdU. Esta circunstancia coincidía con una disminución en el número de células NG2, sugiriendo que los oligodendrocitos podrían derivar de las células NG2 (Watanabe y cols., 2002). Sin embargo, no todas las células NG2 asociadas a la cicatriz glial son precursoras de oligodendrocitos, pues las células meníngeas y algunos macrófagos invasores también expresan NG2 (Bu y cols., 2001).

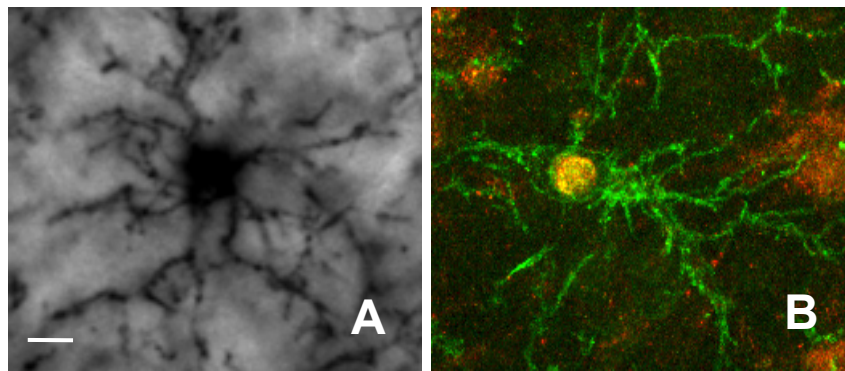


Figura 8: Células inmunorreactivas para NG2 tras una lesión penetrante. (A) Célula inmunorreactiva para NG2. (B) Célula inmunorreactiva para BrdU (rojo) y para NG2 (verde). Tras un daño cerebral se observa un aumento en la expresión del proteoglicano NG2, lo que frecuentemente viene acompañado por un aumento en la proliferación de las células NG2. Escala, 10 μ m.

4- Los andrógenos y los estrógenos regulan la glía reactiva

La mayoría de los estudios que han investigado la acción moduladora o protectora de los andrógenos y los estrógenos en el sistema nervioso se ha centrado en las neuronas. Sin embargo, poco a poco han ido apareciendo un número creciente de trabajos sobre el papel de la glía en estos fenómenos.

Las implicaciones terapéuticas de los andrógenos y los estrógenos, como promotores de la regeneración y prevención de la muerte neuronal es actualmente el objeto de muchos estudios. Se ha demostrado que el estradiol y su precursor, la testosterona, promueven la regeneración sináptica y axonal (Liu y cols., 2008; Sharma y cols., 2008; García-Segura y cols., 2001; García-Ovejero y cols., 2005; Rabbani y cols., 1997; Jones y cols., 1997b; Tanzer and Jones, 1997), inducen la expresión de moléculas antiapoptóticas en neuronas (Nilsen y cols., 2006; Jover-Mengual y cols., 2007; Garcia-Segura y cols., 1998) y protegen a las neuronas de diferentes factores estresantes *in vitro* (Quesada y cols., 2008; Wang y cols., 2006; Chowen y cols., 1992; Behl y cols., 1997; Weaver y cols., 1997) e *in vivo* (Shughrue y cols., 2003; Sudo y cols., 1997; Wang y cols., 2006; Dhandapani y Brann, 2007; Morales y cols., 2006; Corasaniti y cols., 2005; Azcoitia y cols., 1998; Chen y cols., 1998; Dubal y cols., 1998).

Los esteroides sexuales pueden regular la respuesta cerebral a la lesión regulando la gliosis reactiva (Garcia-Estrada y cols., 1993). Las hormonas sexuales pueden regular la expresión en los astrocitos de moléculas implicadas en la respuesta al daño. Por otro lado, el estradiol aumenta, en astrocitos y microglía, la expresión de la apolipoproteína E, molécula implicada en la regeneración neural tras la lesión (Wang y cols., 2006; Struble y cols., 2007; Stone y cols., 1997; Horsburgh y cols., 2002). Además, la testosterona y el estradiol atenúan la expresión de GFAP inducida por el daño (Sandhir y cols., 2008; Ritz y cols., 2008; Djebaili y cols., 2005; Day y cols., 1990). Adicionalmente, los esteroides sexuales regulan la proliferación astrocitaria y la acumulación de astrocitos reactivos en el borde de la herida (García-Estrada y cols., 1993).

La microglía también puede ser una diana de los andrógenos y los estrógenos. En un estudio llevado a cabo por Stone y cols., (1997) se demostró que el estradiol aumenta la expresión y secreción de ApoE *in vivo* por la microglía. Además, el estradiol inhibe la apoptosis en cultivos de microglía, al aumentar la producción de la proteína antiapoptótica Nip2 (Vegeto y cols., 1999). Otros estudios han mostrado que el estradiol inhibe en cultivos de microglía la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible, y consecuentemente la producción de óxido nítrico, provocada por la estimulación con lipopolisacárido bacteriano y las citoquinas pro-inflamatorias IFN- α y TNF- β (Bruce-Keller y cols, 2000; Drew and Chavis, 2000; Bruce-Keller y cols., 2001; Vegeto y cols., 2001). Más aún, Vegeto y colaboradores (Vegeto y cols, 2001) han descrito que el pretratamiento con estradiol reduce la producción inducida por LPS de

otras moléculas pro-inflamatorias en la microglía *in vivo* e *in vitro*, como la prostaglandina-E(2), y la metaloproteinasa de matriz-9. Además, se ha descrito que en el cerebro de ratones viejos, el estradiol disminuye el número de células de microglía en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo. Por otra parte, el estradiol mantiene a la microglía residente en reposo (Lei y cols, 2003) y aumenta la recaptación de la proteína beta amilácea por la microglía derivada de corteza humana (Li y cols., 2000). Alguno de estos efectos dependen de la expresión de receptores de estrógenos (Vegeto y cols, 2001; Vegeto y cols., 2003; Tapia-Gonzalez y cols., 2008). De hecho, recientemente se ha detectado la expresión de receptores de estrógeno por la microglía *in vivo* (Tapia-Gonzalez y cols., 2008). Sin embargo, la acción estrogénica sobre la activación de la microglía podría también estar mediada por otros tipos celulares y por efectos sobre el sistema inmune periférico.

Poco se sabe sobre el efecto de las hormonas sexuales en las células NG2. Se han descrito algunos efectos de la progesterona, la corticosterona y la dexametasona sobre la expresión y proliferación oligodendrocitaria (Alonso, 2000; Ghoumari y cols., 2005; Labombarda y cols., 2006; De Nicola y cols., 2006; Zhong y cols., 2007). Además, la progesterona aumenta la expresión de las células NG2 tras una lesión medular (Labombarda y cols., 2006) y en cultivos organotípicos de cerebelo (Ghoumari y cols., 2005). Por otro lado, el tratamiento con corticosterona inhibe la proliferación oligodendrocitaria en la sustancia gris y la sustancia blanca cerebrales (Alonso, 2000). Muy pocos estudios, por otro lado, han analizado el efecto del estradiol en las células precursoras de oligodendrocitos (Takao y cols., 2004; Hirahara y cols., 2008; Okada y cols., 2008; Guzmán y cols., 2005). La existencia del receptor alfa y beta de estrógenos en oligodendrocitos demuestra que estas células pueden ser influenciadas por los distintos compuestos estrogénicos (Zhang y cols., 2004; Marin-Husstege y cols., 2004; Takao y cols., 2004). Las células NG2 también expresan el receptor de progesterona (Ghoumari y cols., 2005).

5- Modelo de Lesión Cerebral Penetrante

La lesión cerebral penetrante es uno de los mejores modelos para estudiar la gliosis reactiva en el sistema nervioso central. A diferencia de los modelos tóxicos y desmielinizantes, la lesión traumática cerebral provoca la formación de una cicatriz glial. Las células que participan en la formación de la cicatriz glial son astrocitos, microglia, macrófagos, células NG2 y células que migran desde la meninge (Carbonell y Boya, 1988; Hampton y cols., 2006). Como se ha comentado anteriormente, con la

lesión los astrocitos se hipertrofian, cambian su morfología y la composición de su citoesqueleto, sobreexpresando proteínas de los filamentos intermediarios. En la proximidades al borde de la herida se encuentran numerosos astrocitos que expresan vimentina y GFAP. Por otro lado, la reactividad astrogial disminuye progresivamente al alejarse de la lesión (Hozumi y cols., 1990; Janeczko, 1993). Además de cambiar su fenotipo morfológico y molecular, los astrocitos proliferan en la proximidad de la lesión a partir del día 1, alcanzando un máximo de proliferación a los 3-4 días, aunque aún se encuentran células proliferantes 8 días después de la lesión (Janeczko, 1993; Amat y cols., 1996). El pico máximo de proliferación astrocitaria, coincide con la producción de factores de crecimiento, como TGF- β (Logan y cols., 1994), IGF-1 (Walters y cols., 1997), y FGF (Logan y cols., 1992).

La microglía también contribuye a la formación de la cicatriz glial respondiendo rápidamente a una lesión cerebral penetrante, manifestada por la hipertrofia del soma y las prolongaciones y alteración en la expresión de varias moléculas de superficie celular, incluyendo el receptor del complemento cd11-b y el MHC-II (Graeber y cols., 1988). Además, los monocitos/macrófagos salen de la circulación y ocupan las zonas dañadas, pudiendo expresar también, muchos marcadores microgliales. Por otra parte, se detecta proliferación de la microglía a partir de las 24 horas tras la lesión, alcanzando el máximo de proliferación entre los días 2 y 3, aunque aún se observa microglía proliferante 4 días después de la lesión (Amat y cols., 1996; Ziaja y Janeczko, 1993).

Las células NG2 responden rápidamente a una lesión traumática cerebral, siendo más evidente su participación en la cicatriz glial al cabo del primer día después del daño (Levine, 1994; Nishiyama y cols., 1999). En lesiones corticales, la mayoría de las células BrdU positivas, que componen la cicatriz glial, son también positivas para NG2. Las células NG2, al igual que los astrocitos, se hipertrofian, presentando muchas prolongaciones y una inmunorreactividad para NG2 aumentada, durante los 14 días posteriores a la lesión (Hampton y cols., 2006).

Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Nuestra hipótesis es que los esteroides sexuales pueden favorecer la reparación del tejido cerebral lesionado regulando la gliosis reactiva. Por lo tanto el objetivo principal de nuestro estudio fue caracterizar el efecto de la testosterona y de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona sobre la reactividad glial (astrocitos, microglia, células NG2) en un modelo de lesión cerebral penetrante en ratas. Además, teniendo en cuenta que las hormonas sexuales pueden tener efectos periféricos no deseados, exploramos el posible efecto anti-inflamatorio de los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) que carecen de estos efectos periféricos. En concreto nuestros objetivos específicos fueron los siguientes:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto de la testosterona y sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona en la astrogliá reactiva, la microglía reactiva y las células NG2 tras una lesión cerebral penetrante en ratas jóvenes.
2. Determinar el efecto de distintos compuestos estrogénicos sobre la astrogliá reactiva, la microglía reactiva y las células NG2 tras una lesión cerebral penetrante en ratas jóvenes.
3. Determinar si el efecto sobre la gliosis reactiva de la testosterona y sus metabolitos y de los compuestos estrogénicos es diferente dependiendo de que los tratamientos se efectúen en los primeros días después de la lesión, cuando se está activando la glía, o de que se efectúen varios días después de la lesión, cuando la glía ya está activada y ya se ha formado la cicatriz glial.
4. Determinar a través de qué receptor se produce el efecto antiinflamatorio de los compuestos estrogénicos mediante el tratamiento con agonistas selectivos de los receptores alfa y beta de estrógenos.
5. Determinar si la acción antiinflamatoria de los compuestos estrogénicos se mantiene en ratas viejas y si se ve afectada por una privación previa prolongada de hormonas ováricas.
6. Determinar si las células NG2 expresan los receptores de estrógeno.

Material y Métodos

1- Protocolos Generales

1.1- Animales empleados

Para todos los experimentos se utilizaron ratas adultas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza *Wistar*. Los animales procedían del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (ANUC), en cuyas instalaciones fueron criados en condiciones estándar: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, humedad relativa del ambiente entre el 50 y el 55%, ciclos de luz-oscuridad 12:12h, alimentación con pienso artificial equilibrado para roedores y libre disponibilidad de agua.

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (86/609/EEC). Se procuró emplear el menor número de animales en cada diseño experimental. Los animales operados recibieron un trato cuidadoso y se procuró evitarles sufrimiento innecesario. Todos los animales fueron anestesiados antes de cualquier intervención quirúrgica. El estado de sedación se determinó como la ausencia de reflejo de retirada en respuesta a un estímulo táctil en la cola y la planta del pie y ausencia de reflejo palpebral al estimular la superficie del ojo.

2- Castración

La resección quirúrgica completa y bilateral de las gónadas se realizó en los animales profundamente anestesiados, con una mezcla de halotano y aire (oxígeno medicinal) al 2-3%. Para la inducción de la anestesia, la concentración de la mezcla se elevó al 5%. Con el fin de evitar una hipotermia excesiva, los animales permanecieron sobre una manta calefactora (37°C aproximadamente) durante todo el proceso quirúrgico.

2.1- Orquidectomía

Una vez rasurada y desinfectada con etanol (70%) la región escrotal, se practicó una incisión longitudinal en el septo medial de aproximadamente 1,5 cm. A continuación, se abrió cada cápsula testicular, y se ligó el conducto espermático por encima de la cabeza del epidídimo, con seda de ácido poliglicólico absorbible (Ercelab #31003#, España). La herida se cerró y se cosió la piel del escroto con sutura estéril (Ercelab #555157#, España).

2.2- Ovariectomía

Se escogió la ruta de acceso dorsal para proceder a la ovariectomía, tomando como referencia las vértebras lumbares. Una vez rasurada y desinfectada la piel, se hizo una incisión medial única, desde la cual se accedió a la musculatura abdominal de cada uno de los lados del animal. Seguidamente se separaron los correspondientes paquetes musculares, con la punta de unas tijeras romas, para dar acceso a la cavidad peritoneal. Con unas pinzas se sacó la grasa peritoneal de la región lumbar, en la cual está embutido el ovario, y se hizo un lazo, con sutura reabsorbible estéril, alrededor de la parte distal del oviducto. Por último se resecó completamente el ovario y se suturaron el músculo, con seda estéril y la piel, con grapas quirúrgicas. El proceso se repitió con el ovario del otro lado del animal.

3- Modelo de Lesión cerebral

Hemos empleado un modelo de lesión penetrante que afecta al hipocampo y a la corteza cerebral. Los animales se anestesiaron con la mezcla de halotano y aire anteriormente referida y se colocaron en un aparato estereotáxico Kopft, con la barra de los dientes incisivos situada en la posición de -3,5 mm. Se tomaron las coordenadas estereotáficas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986). Después de rasurar y limpiar la zona con etanol, se realizó una incisión con bisturí en el cuero cabelludo y se practicó una trepanación longitudinal en el cráneo con una broca dental. Las coordenadas del punto inicial fueron 2 mm lateral y 2 mm caudal a bregma y las del punto final, 2 mm lateral y 5 mm por detrás de bregma. Por esta trepanación desplazamos una aguja de acero, roma, de 0,45 mm de diámetro, introducida hasta una profundidad de 5,5 mm desde la superficie del cerebro. La herida, siempre en el hemisferio izquierdo, tenía una extensión final antero-posterior de 3mm. Finalmente, se retiró la aguja, se detuvo la eventual pérdida de sangre con gasas estériles y se cerró la piel de la cabeza con sutura estéril.

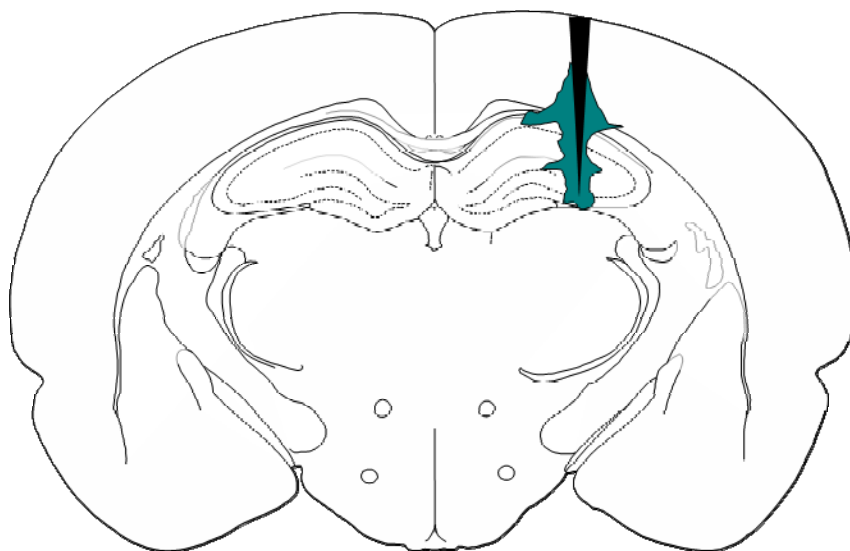


Figura 9: Lesión Penetrante de la corteza parietal y el hipocampo anterior dorsal. La figura demuestra el recorrido de la aguja desde su inserción hasta la profundidad seleccionada de 5,5 mm. La lesión tiene que realizarse de forma que no se vean afectadas las células granulares de la circunvolución dentada. Si la lesión se encontraba demasiado alejada o dentro del giro dentado, el animal era descartado. Todas las secciones y cortes utilizados para todos los estudios experimentales han sido rigurosamente seleccionadas para que se tenga la máxima homogeneidad, siendo el lugar de la lesión importante para mantener las mismas condiciones experimentales para todos los experimentos.

4- Procesamiento de los tejidos

4.1- Perfusión

Los estudios de inmunohistoquímica se llevaron a cabo sobre tejido fijado por perfusión. Los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal) y perfundidos a través de la arteria aorta (ruta transcardial) con 50 ml de solución salina (NaCl al 0,9% en agua destilada), seguidos de 200 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato de Sorensen 0,1 M (pH 7,4). Los cerebros se mantuvieron en post-fijación por inmersión durante toda la noche en la misma solución de paraformaldehído. Una vez fijados, los cerebros se cortaron a un grosor de 50 μ m, para los experimentos con ratas y 40 μ m, para los experimentos con ratones, con un Vibratomo Leica VT1000S (Heidelberg, Alemania). Los cortes obtenidos se almacenaron hasta su uso a -15°C en una solución crioprotectora compuesta por 30% de etilenglicol, 30% de sacarosa y 60% de tampón fosfato 0,1M.

5- Tinciones Inmunohistoquímicas e Histológicas

Este ensayo se llevó a cabo en secciones de tejido en flotación, escogiendo aquéllas que mostraran una lesión completa desde el límite dorsal hasta el ventral del hipocampo.

5.1- Inmunoperoxidasa

Todos los lavados e incubaciones fueron realizados en agitación moderada, utilizando una solución de lavado compuesta por tampón fosfato 0,1M; pH 7,4; con 0,3% de Tritón X-100 y 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA). Este tampón se utilizó también para diluir los anticuerpos. Una vez lavadas las secciones, se inhibió la actividad peroxidasa endógena, incubando las secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol al 30%. Tras lavar profusamente, se incubaron los cortes durante dos noches a 4°C en anticuerpo primario, para vimentina (1:500; monoclonal, DAKO), para microglia (MHC-II; 1:250, monoclonal, MCA46G, Serotec) o para NG2 (1:400; policlonal, Chemicon, CA). A continuación, fueron aclaradas en solución de lavado e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario biotinilado, generado en cabra contra inmunoglobulinas G de ratón (en el caso que el primer anticuerpo sea vimentina o MHC-II) y generado en cabra contra inmunoglobulinas de conejo (para NG2). A continuación, fueron aclaradas en solución de lavado e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario biotinado. Una vez realizados los lavados pertinentes, los cortes se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (diluido 1:250; ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce). El producto de la reacción fue revelado mediante 2 µg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España) y 0,01% de H₂O₂ en tampón fosfato 0,1M. A continuación, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, deshidratadas, cubiertas con DEPEX (BDH Laboratory Supplies, England) y observadas con un microscopio Leica DMRB-E.

5.2- Doble inmunofluorescencia para BrdU y Vimentina o NG2

Todos los lavados e incubaciones fueron realizados en agitación moderada. Los anticuerpos se diluyeron en tampón fosfato 0,1M; pH 7,4 y los lavados también se realizaron con este tampón. Tras lavar los cortes, éstos fueron sometidos a tratamiento ácido para exponer el ADN de la célula con una solución de HCl 2N durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron profusamente las secciones y se incubaron con el anticuerpo primario anti-BrdU, durante dos noches a 4°C. En el caso de la tinción doble con anti-vimentina, se usó una anti-BrdU policlonal generada en oveja (Abcam, UK) y diluida 1:50, mientras que para la co-localización con anti-NG2, se empleó una anti-BrdU monoclonal, diluida 1:1000 (Hybridoma Bank, University of Connecticut, EEUU). Tras lavar, se incubaron con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G de oveja o de ratón, conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (rojo; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU), durante 2 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, que se mantendrán a partir de este momento durante todo el proceso. A continuación, se lavó de nuevo y se realizó la incubación con el anticuerpo primario monoclonal para vimentina o policlonal para NG2 durante dos noches a 4°C. Los cortes fueron lavados e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G de ratón (para vimentina) o conejo (para NG2), generado en cabra y conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (verde; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU). Tras realizar nuevos lavados, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, cubiertas con gerbatol y cubreobjetos y observadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5.

5.3- Doble inmunofluorescencia para NG2 y el receptor de estrógenos y andrógenos

Se realizó el mismo procedimiento descrito arriba, si bien empleando el anticuerpo monoclonal anti-NG2 (1:200; Chemicon, CA) conjugado con el anticuerpo policlonal anti-receptor alfa (1:200; Santa Cruz, CA) o beta (1:200; Zymed) de estrógenos. Tras dos días de incubación, a 4°C con el anticuerpo anti-NG2, las secciones se lavaron profusamente y se incubaron con el anticuerpo secundario generado en cabra contra inmunoglobulinas G de ratón, conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (rojo; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU) durante dos horas. Las secciones se lavaron y fueron incubadas con el anticuerpo primario para los diferentes receptores de esteroides gonadales durante dos días a 4°C. Tras lavar, se incubaron con el

anticuerpo secundario, generado en cabra y conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (verde; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU) durante dos horas y, posteriormente, fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, cubiertas con gerbatol y cubreobjetos y observadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5.

5.4- Doble inmunofluorescencia para BrdU y MHC-II

Para el doble marcaje con BrdU y MHC-II, se realizaron los mismos procedimientos descritos arriba para la inmunohistoquímica revelada con DAB. Tras lavar los cortes, éstos fueron sometidos a tratamiento ácido para exponer el ADN de la célula con una solución de HCl 2N durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron profusamente las secciones y fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal anti-BrdU, diluido 1:50 (Abcam, UK) durante dos noches a 4°C. A continuación, fueron lavadas en solución de lavado e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario, generado en cabra, contra inmunoglobulinas G de oveja, conjugado con biotina (diluido 1:300; Pierce, Rockford, IL, USA). Una vez realizados los lavados pertinentes, los cortes fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, diluido 1:250. El producto de la reacción fue revelado en un medio que contenía 2 µg/ml de DAB y 0,01% de H₂O₂ diluidos en tampón fosfato 0,1M. Con el fin de intensificar la reacción y facilitar la visualización de los núcleos celulares positivos para BrdU, se adicionó al medio sulfato de níquel-amonio (concentración final del 2%) y cloruro de cobalto (concentración final del 2%). Después de lavar, las secciones se incubaron durante 2 noches a 4°C en un anticuerpo monoclonal para microglía (MHC; dilución 1:250, Serotec). A continuación, se lavaron e incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario, generado en cabra, contra inmunoglobulinas G de ratón y conjugado con biotina (diluido 1:300; Pierce, Rockford, IL, USA). Una vez realizados los lavados pertinentes, los cortes se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (diluido 1:250). El producto de la reacción fue revelado en un medio que contenía 2 µg/ml de DAB y 0,01% de H₂O₂ diluidos en tampón fosfato 0,1M. A continuación, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, contrastadas con azul de toluidina, deshidratadas, cubiertas con DEPEX y cubreobjetos y observadas con un microscopio Leica DMRB-E.

5.5- Triple inmunofluorescencia para BrdU, NG2 y GFAP o vimentina

Se realizó el mismo proceso para la inmunohistofluorescencia descrito anteriormente, siendo que llevamos a cabo las tres inmunohistoquímicas por separado. Primeramente sometimos los cortes a un tratamiento ácido para exponer el ADN de la célula con una solución de HCl 2N durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron profusamente las secciones e incubamos las secciones con el anticuerpo primario policlonal (oveja; Abcam, UK) para BrdU por dos noches a 4°C. Tras lavar, se incubaron con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G de oveja, conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (rojo; diluido 1:1000, Invitrogen, USA), durante 2 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. A continuación, se lavó de nuevo y se realizó la incubación con el anticuerpo primario policlonal para NG2 (1:400; Chemicon, CA) durante dos noches a 4°C. Los cortes fueron lavados e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G de conejo, generado en cabra y conjugado con el fluorocromo Alexa 350 (azul; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU). Tras las dos primeras inmunohistoquímicas, procedimos con la tercera, incubando las secciones con el anticuerpo monoclonal para vimentina (1:500; DAKO) o bien el monoclonal para GFAP (1:1000; Sigma, UK) por dos noches a 4°C. Tras la incubación, los cortes fueron lavados e incubados durante dos 2 horas con el anticuerpo secundario generado en cabra contra inmunoglobulinas G de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (verde; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU). Tras realizar nuevos lavados, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, cubiertas con gerbatol y cubreobjetos y observadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5.

Tabla 1: Anticuerpos Primarios empleados:

Anticuerpos Primarios	Especie	Dilución	Referencia
Vimentina (V9)	Ratón	1:500	DAKO
GFAP policlonal	Conejo	1:1000	DAKO
MHC-II monoclonal	Ratón	1:250	Serotec
MHC-II para ratón	Rata	1:500	Serotec
GFAP monoclonal	Ratón	1:1000	Sigma
NG2 policlonal	Conejo	1:400	Chemicon
NG2 monoclonal	Ratón	1:200	Chemicon
MAC-1 (MCA74GA)	Rata	1:200	Serotec
Receptor de estrógenos alfa (MC-20) policlonal	Conejo	1:200	SC542; Santacruz, CA
Receptor de estrógenos beta policlonal	Conejo	1:200	Zymed
BrdU monoclonal	Ratón	1:1000	Hybridoma Bank; EEUU
BrdU policlonal	Oveja	1:50	Abcam, UK

Tabla 2: Anticuerpos Secundarios empleados:

Anticuerpos Secundarios	Especie	Dilución	Referencia
Cabra anti IgG de conejo biotinado	Cabra	1:1000	Pierce
Conejo anti IgG de rata biotinado	Conejo	1:1000	Pierce
Cabra anti IgG de ratón biotinado	Cabra	1:1000	Pierce
Conejo anti IgG de oveja biotinado	Conejo	1:1000	Pierce
Cabra anti IgG de ratón Alexa rojo	Cabra	1:1000	Invitrogen
Cabra anti IgG de conejo Alexa verde	Cabra	1:1000	Invitrogen
Cabra anti IgG de ratón Alexa rojo	Cabra	1:1000	Invitrogen
Cabra anti IgG de conejo Alexa verde	Cabra	1:1000	Invitrogen
Cabra anti IgG de conejo Alexa azul	Cabra	1:1000	Invitrogen
Burro anti IgG de oveja Alexa rojo	Burro	1:1000	Invitrogen

5.6- Controles de Especificidad

En las pruebas inmunohistoquímicas se llevaron en paralelo distintos controles de especificidad. Sólo se consideraron válidas para estudio las pruebas en las que estos controles aparecían sin marcajes:

1. Omisión del anticuerpo primario: realizado para descartar que la señal se debiera a uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios o a fondo derivado de otras etapas del proceso.

2. Control de reactividad cruzada: empleado en los experimentos de colocalización, para descartar posibles interferencias entre las dos parejas de anticuerpos. Se incubaron las secciones con uno de los anticuerpos primarios para marcadores gliales (todos generados en ratón), y a continuación con ambos anticuerpos secundarios: un anti IgG de conejo marcado con Alexa verde y un anti IgG de ratón marcado con Alexa roja.

3. Control de autofluorescencia: Para descartar fluorescencia intrínseca del tejido, en la inmunohistoquímica con fluorescencia se incluyeron cortes incubados en ausencia tanto del anticuerpo primario como del secundario.

6- Métodos de valoración y cuantificación

6.2- Análisis morfométrico

El avance más importante en el recuento estereológico o no sesgado de estructuras microscópicas fue la introducción del método del disector (Sterio, 1984). El disector consiste en la obtención de parejas de secciones separadas por una distancia conocida. El recuento de una partícula incluida en la estructura sólo es válido si aparece contenida en una sección y no en la siguiente. El problema de este método reside en la obtención de parejas de secciones de distancia conocida, que cumplan una probabilidad uniforme de que aparezca el objeto de interés. Para salvar este problema y obtener un aumento de la eficacia de recuento, se puede utilizar un método de barrido continuo. En microscopia óptica se puede obtener este barrido si se utilizan “secciones ópticas” dentro de un corte de cierto grosor. Eso se lleva a cabo determinando el grosor de una sección y barriendo toda la altura de la misma con el foco del microscopio, determinando como limite superior las primeras células que aparezcan enfocadas. Esto se conoce como “disector óptico”, y es el principio que hemos aplicado a nuestras muestras, de la manera que lo describen Howard y Reed (1998).

6.2- Análisis estereológico para el recuento de astrocitos y células NG2

Empleamos la técnica del disector óptico, tal y como está descrita por Howard y Reed (Howard y Reed, 1998), para el recuento de astrocitos inmunorreactivos para vimentina y de células precursoras de oligodendrocitos inmunorreactivas para NG2. El número de astrocitos reactivos y de células NG2 fue contado dentro de los límites del hipocampo y hasta 350 μm del borde exterior de la lesión. Utilizamos el grosor total de la sección como altura del disector (von Bartheld, 1999; Hatton y von Bartheld, 1999), y un visor de recuento de 55 x 55 μm . Se contaron 78 campos por animal (Figura 10). El grosor de los cortes se midió utilizando un mecanismo digital de medida de longitud (Heidenhain-Metro MT 12/ND221, Traunreut, Alemania), acoplado a un microscopio Leitz. El volumen del hipocampo fue estimado usando el método de conteo por puntos de Weibel (1979). Como no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los distintos grupos experimentales, los cambios en el número de células inmunorreactivas para vimentina por unidad de volumen con esta técnica, reflejan cambios en el contenido de dichas células. Aplicamos la siguiente fórmula para conocer el número de células por milímetro cúbico a partir del número de células por campo:

$$N^{\circ} \text{ cels/mm}^3 = (N \times 1000) / (A \times Z), \text{ donde}$$

N = número de células por campo
 A = área del campo (mm^2)
 Z = grosor del corte

Con el fin de minimizar el sesgo en la evaluación, todos los recuentos fueron realizados sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones.



Figura 10: Inmunohistoquímica para vimentina tras una lesión traumática en el hipocampo de un animal orquidectomizado inyectado con testosterona. Realizamos el recuento de los astrocitos vimentina positivos y células NG2 utilizando una plantilla (cuadros) a tres distancias distintas desde el borde lateral de la lesión (0-115, 115-230 y 230-350 micras).

6.3- Estimación de la densidad de volumen para el análisis de la microglía

La medida estereológica de las áreas evaluadas (área hipocampal para el recuento de células en degeneración), se realizó siguiendo la técnica de conteo de puntos descrita por Weibel (1979). La técnica consiste en lo siguiente:

Si tenemos una sección con varias figuras contenidas en ella, podemos superponer una plantilla cuadriculada que cubra a la figura completa. Intuitivamente, está claro que el número de cuadrados contenidos en cada figura o perfil está estimando el área de la figura en relación con el número total de cuadrados de la sección. Si uno de los sectores de la cuadrícula se corta con la figura, se considera incluido, si al menos la mitad del cuadrado está dentro de la figura. Una referencia que facilita esta decisión es marcar el punto central de cada cuadrado: si este se encuentra en la figura, se asigna el cuadrado a la misma. Entonces, podríamos olvidarnos de los cuadrados y tener en cuenta sólo los puntos centrales en la figura.

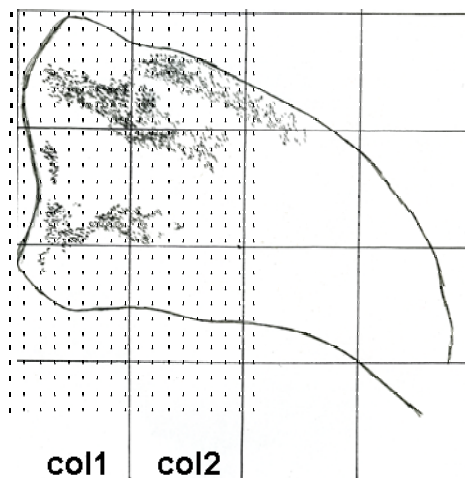


Figura 11: La estimación de la microglía reactiva, se realizó en base a la técnica del conteo por puntos, descrita en detalle por Weibel (1979) y que nos permite conocer la superficie del corte en la que hay inmunorreactividad en relación a la superficie hipocampal. Para ello, se dibujó el contorno del hipocampo, usando un microscopio Leitz acoplado a una cámara clara. Se superpuso luego una rejilla de puntos a los dibujos, y se contó el número total de puntos incluidos en el hipocampo (volumen de referencia), así como el número de puntos incluidos

en células reactivas, hasta una distancia de 300 μm , tomada desde el borde de la lesión hacia la zona lateral (hacia la fimbria-fornix). El área asociada a cada punto era de 614 μm^2 . Cada columna en el esquema corresponde a una distancia de 300 μm en hipocampo. La fracción de volumen ocupado por la microglía reactiva fue calculada para cada animal como la relación entre la suma de puntos incluidos en células reactivas y el número de puntos incluidos en el volumen de referencia. Se evaluaron al menos 3 secciones de cada animal. Todos los recuentos se realizaron sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones.

A partir de cortes de 50 μm de grosor (para ratas) y 40 μm (para el estudio con ratones KO), teñidos para MHC-II o Fluoro Jade y utilizando un microscopio Leiz

Laborlux S con cámara clara acoplada, se dibujaron los perfiles descritos con un objetivo 5x. Se superpuso sobre los mismos una rejilla de puntos con un área asociada a cada punto de $614 \mu\text{m}^2$ (para el análisis de células inmunorreactivas para MHC-II).

6.4- Doble marcaje con BrdU y Vimentina o NG2

Para contar aquellos astrocitos reactivos (vimentina) y células precursoras de oligodendrocitos (NG2) que habían incorporado BrdU, empleamos fotos de las secciones histológicas obtenidas con el objetivo de 20x y zoom 1,4 en el microscopio confocal. Se realizaron fotos que incluían la zona de lesión en CA1 del hipocampo, empezando en el plano superior del corte y avanzando en secciones ópticas de $2 \mu\text{m}$, hasta alcanzar $10 \mu\text{m}$ de espesor (eje Z). Utilizamos el programa ImageJ 1.37m (National Institute of Health, USA), en cuyo visor situamos una rejilla con un área por sector de $50 \times 50 \mu\text{m}$ sobre los distintos planos tomados a las secciones. En la rejilla, contamos el número de células que colocalizaban ambos marcadores desde el borde exterior de la lesión y hasta $400 \mu\text{m}$ hacia el lateral del hipocampo (8 sectores). Se contaron un total de 144 sectores por animal. Para calcular el número de células que mostraban colocalización por unidad de volumen (mm^3), tuvimos en cuenta $10 \mu\text{m}$ de profundidad, y empleamos la misma fórmula que la utilizada para la técnica del disector óptico. Todos los recuentos se realizaron sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones.

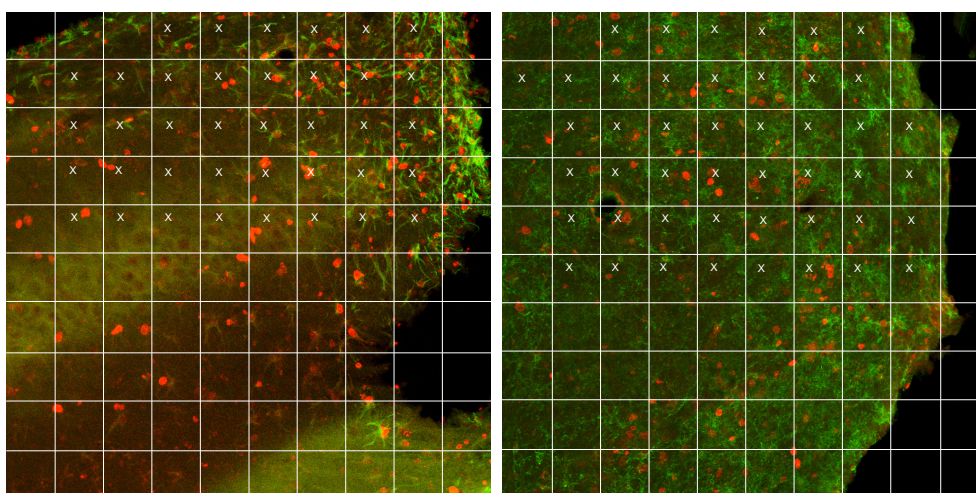


Figura 12: Recuento estereológico para el doble marcaje de secciones inmunohistofluorescentes para BrdU+ Vim+ y BrdU+ NG2+ utilizando el programa ImageJ. Tuvimos en cuenta las células que expresaban el doble marcaje dentro del área delimitada hasta una distancia de $400 \mu\text{m}$ en CA1, desde el borde lateral de la lesión (en ese caso marcado con la "X").

6.5- Doble marcaje con BrdU y MHC-II

Se utilizó la misma técnica para el recuento de astrocitos inmunorreactivos para vimentina y células NG2 (sección 2.7.1). En este caso, tuvimos en cuenta las células que expresaban ambos marcadores, BrdU y MHC-II, hasta una distancia de 350 μm desde el borde lateral de la lesión.

6.6- Triple marcaje con BrdU, NG2 y GFAP o vimentina

Para el recuento morfométrico de las secciones teñidas con el triple marcaje, empleamos fotos de los cortes tomadas con el objetivo de 63x en el microscopio confocal. Se realizaron fotos del borde de la lesión hacia fuera en CA1 del hipocampo, hasta un total de 15 μm de profundidad. Cada plano tenía un grosor de 1 μm , obteniéndose aproximadamente entre 12 y 15 fotos por cada corte. Empleando esta magnificación, el área total de tejido analizado fue de 150 μm^2 . Utilizando el programa ImageJ se contabilizaron las células inmunorreactivas para BrdU, NG2, GFAP o Vimentina, doblemente inmunorreactivas para BrdU/NG2, BrdU/GFAP o BrdU/Vimentina y triplemente inmunorreactivas para BrdU/NG2/GFAP o BrdU/NG2/Vimentina. Para el recuento, superpusimos una rejilla de 50 x 50 μm y se contabilizaron 9 campos por corte en un total de 27 sectores por animal.

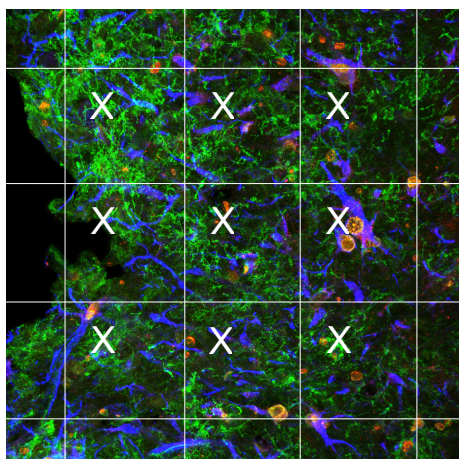


Figura 13: Recuento estereológico de las secciones inmunohistofluorescentes para BrdU, NG2 y vimentina en CA1 del hipocampo en un animal inyectado con vehiculo y sacrificado en el día 2 tras la lesión penetrante. Para el recuento estereológico, hemos utilizado fotos de CA1 tomadas con el objetivo de 63X de un microscopio confocal, a las que superpusimos una rejilla de 50 x 50 μm hasta 150 μm de distancia desde el borde de la lesión.

7- Análisis Estadístico de los resultados

Hemos empleado en este trabajo análisis estadísticos basados en la comparación de medias con datos no pareados. Para todas las pruebas empleamos el paquete estadístico GraphPad Prism versión 4.01.

Se aplicaron pruebas paramétricas a las muestras que cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad (igualdad de varianzas). El nivel de significación estadística se estableció siempre en valores de p menores de 0,05. La igualdad de varianzas se determinó con un valor de estadístico de Levene que ofreciera una $p > 0,05$. En caso de resultar varianzas distintas, se emplearon pruebas no paramétricas. Para varianzas homogéneas se procedió de la siguiente manera:

Los experimentos que comparaban sólo 2 tratamientos, se analizaron con la prueba T de Student. Esta prueba se empleó también en comparaciones de 2 muestras con varianzas no homogéneas. En este caso, se aplicó la necesaria corrección, ofrecida por el paquete estadístico.

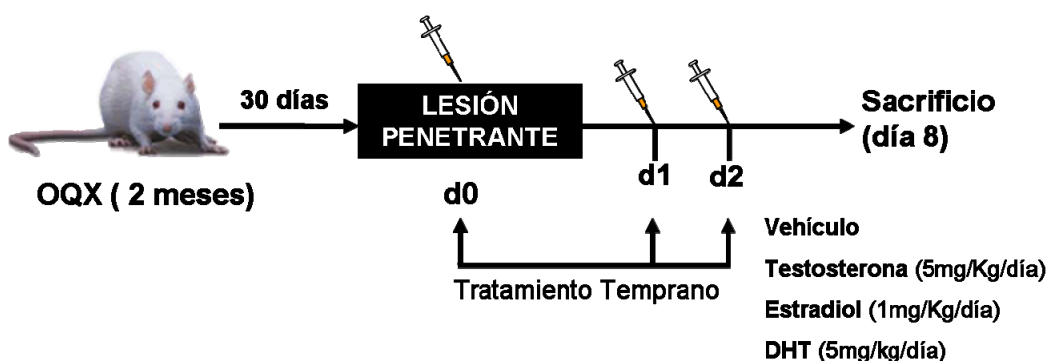
Los experimentos que incluían más de 2 muestras fueron analizados con ANOVA de una vía. En caso de que resultara significativa la prueba, se detallaron las diferencias entre parejas de muestras con comparaciones *post hoc*. Utilizamos para ello las comparaciones de la diferencia significativa menor y el test de Tukey.

En casos particulares, al comparar el efecto de dos variables, como la lesión y el tratamiento hormonal, empleamos un ANOVA de dos vías, obteniendo el nivel de interacción entre las dos variables. Si la interacción resultaba negativa, se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía para cada una de las variables.

En las comparaciones de más de 2 grupos que no cumplían las restricciones de normalidad u homocedasticidad, se empleó el test no paramétrico de rangos de Kruskal-Wallis. Este test supone como hipótesis nula que todas las muestras proceden de una población con la misma mediana.

8- Diseño Experimental

8.1- Efecto de los distintos compuestos hormonales sobre la activación y proliferación de la glía reactiva, en ratas jóvenes lesionadas

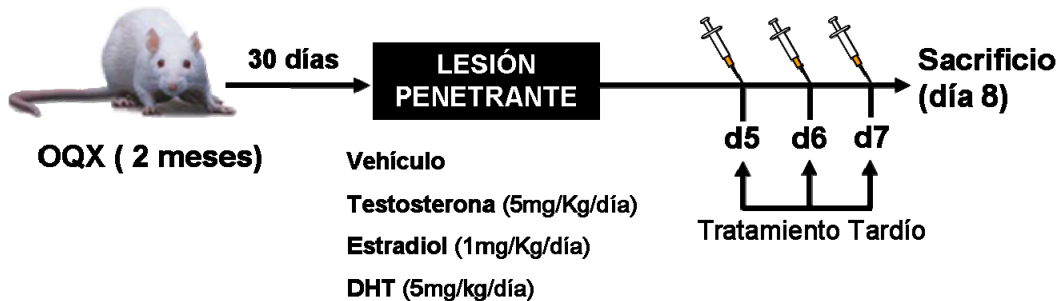


Diseño Experimental 1: Tratamiento hormonal temprano

Se emplearon 6 ratas Wistar macho lesionadas e inyectadas con aceite de maíz (vehículo), 5 animales lesionados e inyectados con testosterona, 6 animales lesionados e inyectados con estradiol y 4 animales lesionados e inyectados con dihidrotestosterona. El tratamiento con los andrógenos fue administrado en los días 0, 1 y 2 tras lesión penetrante y los animales sacrificados en el día 8 post-lesión. Se valoró el efecto del tratamiento con andrógenos en la cicatriz glial en secciones de 50 μm , teñidas para vimentina. Empleando el método del disector óptico, realizamos un recuento de astrocitos positivos para vimentina en las proximidades de la lesión penetrante. Obtuvimos medidas de 3 columnas adyacentes, cada una de las cuales abarcaba una franja de tejido de 115 μm , aproximadamente (columna 1: 0-115 μm ; columna 2: 115-230 μm y columna 3: 230-345 μm). Usamos al menos 3 cortes por animal y al menos 5 animales por tratamiento.

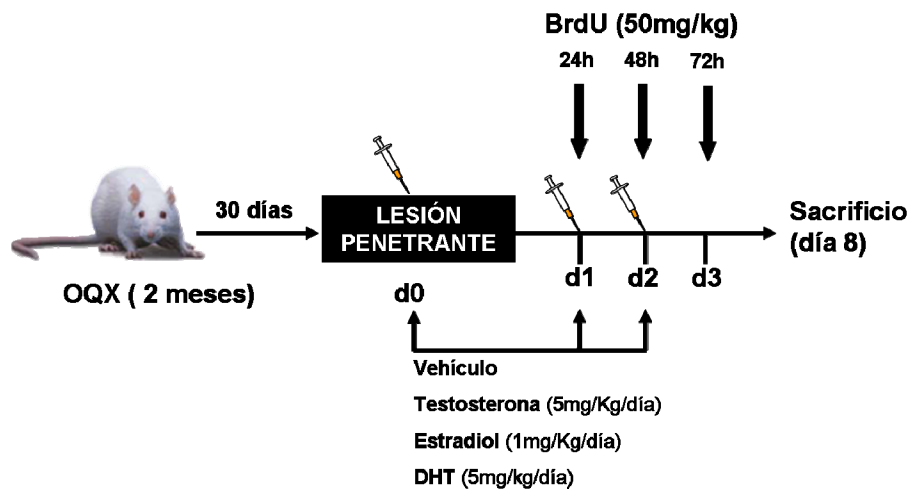
Utilizando los mismos animales que en los experimentos anteriores, se dibujó, con ayuda de una cámara clara, el área ocupada por la microglía MHC-II+, en secciones de 50 μm , teñidas para MHC-II. Posteriormente, se calculó el área de referencia y la proporción de área ocupada por marcaje empleando el método del conteo por puntos.

Diseño Experimental 2: Tratamiento hormonal tardío



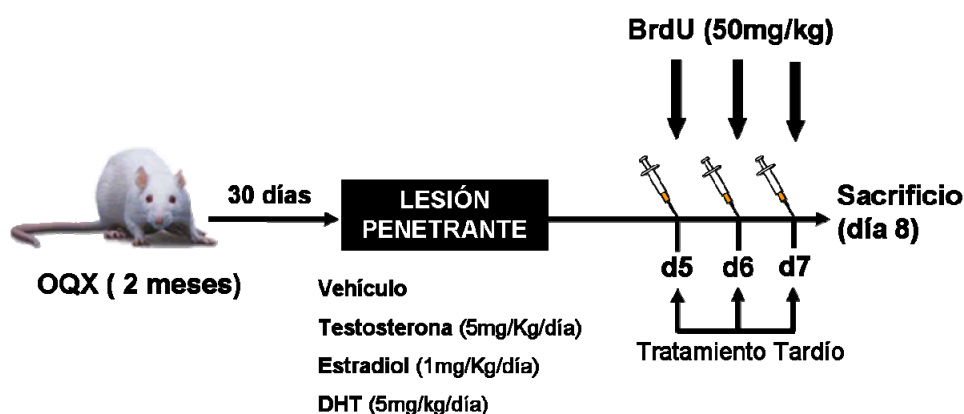
Se emplearon 6 ratas macho lesionadas e inyectadas con aceite de maíz (vehículo), 5 animales lesionados e inyectados con testosterona, 5 animales lesionados e inyectados con estradiol y 4 animales lesionados e inyectados con dihidrotestosterona. A diferencia del experimento anterior, el tratamiento se administró en los días 5, 6 y 7 después de la lesión penetrante y los animales fueron sacrificados en el día 8. Las secciones de 50 μm de grosor fueron teñidas con los mismos marcadores del experimento previamente descrito.

Diseño Experimental 3: Efecto del tratamiento hormonal temprano sobre la proliferación



Se emplearon 20 animales orquidectomizados a los 2 meses de edad a los que se sometió a una lesión penetrante a los 3 meses de edad. Mantuvimos el protocolo descrito arriba, añadiéndole al experimento, el tratamiento con la BrdU (50 mg/Kg/día) en las 24, 48 y 72 horas después de la lesión. Se obtuvieron cortes de vibratomo de 50 μ m de grosor con los que se realizó una doble inmunohistoquímica para BrdU y los marcadores gliales: vimentina, MHC-II y NG2.

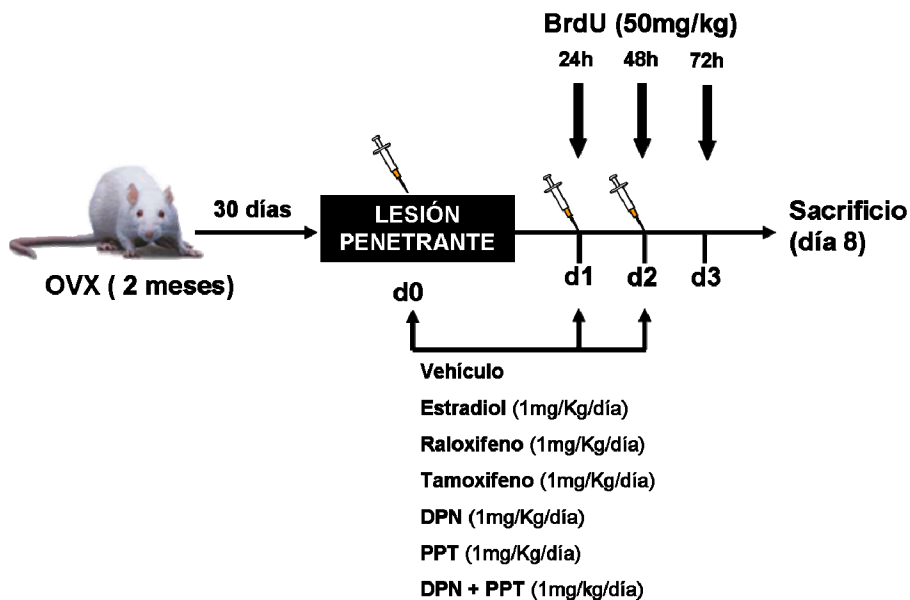
Diseño Experimental 4: Efecto del tratamiento hormonal tardío sobre la proliferación



Empleamos 20 animales orquidectomizados a los 2 meses de edad y lesionados cuando cumplieron los 3 meses. Utilizamos el mismo protocolo descrito anteriormente, sin embargo, pinchamos la BrdU en los días 5, 6 y 7 después de la lesión y los cortes

de 50 micras de grosor fueron doble teñidos para la BrdU conjugado con los vimentina, MHC-II o NG2.

Diseño Experimental 5: Tratamiento temprano con los SERMs

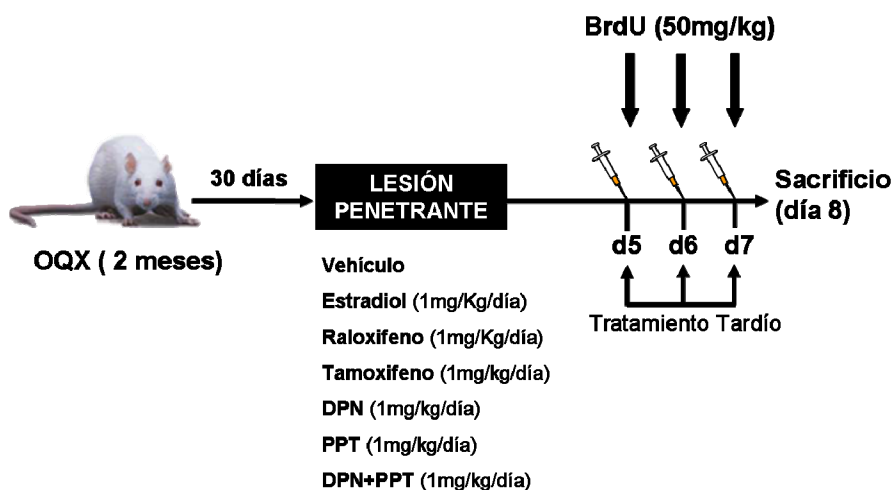


Se emplearon 5 ratas Wistar hembra ovariectomizadas, lesionadas e inyectadas con aceite de maíz (vehículo), 5 animales lesionados e inyectados con estradiol, 6 animales lesionados e inyectados con raloxifeno, 5 animales lesionados e inyectados con tamoxifeno, 4 animales lesionados e inyectados con DPN, 4 animales lesionados e inyectados con PPT y 4 animales lesionados e inyectados con DPN + PPT. El tratamiento con estradiol y los SERMs fue administrado en los días 0, 1 y 2 tras lesión penetrante y los animales sacrificados en el día 8 post-lesión. Se valoró el efecto del tratamiento con el estradiol y los SERMs en el desarrollo de la cicatriz glial, en secciones de 50 μm teñidas para vimentina. Para ello se contaron, empleando el método del disector óptico, los astrocitos positivos para vimentina, en las proximidades de la lesión penetrante. Se obtuvieron medidas de 3 columnas adyacentes, cada una de las cuales abarcaba una franja de tejido de 115 μm , aproximadamente (columna 1: 0-115 μm ; columna 2: 115-230 μm y columna 3: 230-345 μm). Usamos al menos 3 cortes por animal y al menos 4 animales por tratamiento.

Se valoró también la respuesta microglial en estos mismos animales. Para ello se dibujó, con ayuda de una cámara clara, el área ocupada por las células MHC-II+, en secciones de 50 µm, teñidas para MHC-II. Posteriormente, se calculó el área de referencia y la proporción de área ocupada por marcaje, empleando el método de conteo por puntos.

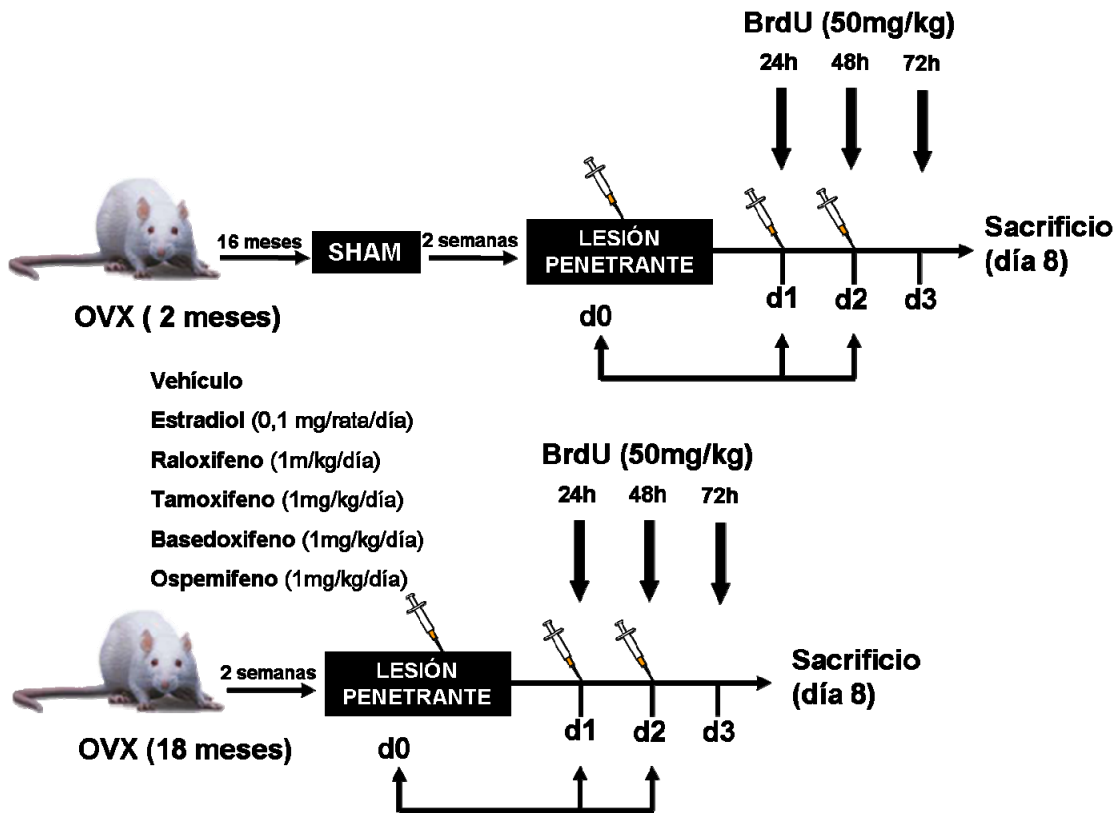
Se utilizaron, además, secciones de 50 µm de grosor para un doble marcaje de BrdU con los marcadores gliales, vimentina, MHC-II y NG2.

Diseño Experimental 6: Tratamiento tardío con los SERMs



En ese estudio se emplearon 4 animales macho orquidectomizados, lesionados y tratados con aceite de maíz (Veh), 5 animales lesionados e inyectados con estradiol (Est), 6 animales lesionados e inyectados con raloxifeno (Ralox), 5 animales lesionados e inyectados con tamoxifeno (Tamox), 4 animales lesionados e inyectados con DPN; 4 animales lesionados e inyectados con PPT y 4 animales lesionados e inyectados con DPN + PPT. Las secciones de 50 µm de grosor fueron teñidas para vimentina, MHC-II y NG2; Por otro lado, para el análisis de la proliferación de células NG2, teñimos los cortes con la BrdU y NG2.

8.2- Efecto del tratamiento temprano con los SERMs, en ratas viejas lesionadas



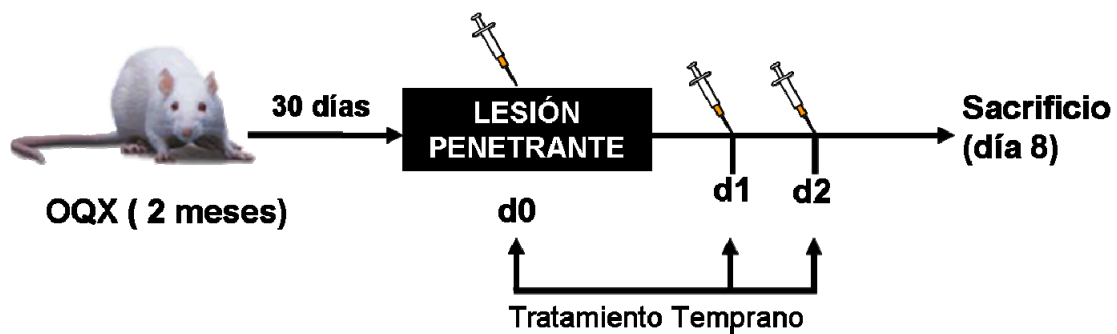
Diseño Experimental

Experimento 1: Se emplearon 35 ratas Wistar hembra de 600-700 gramos de peso corporal sometidas a ovariectomía a los 2 meses de edad. Con el fin evitar el posible efecto debido al estrés quirúrgico, que dificultaría la comparación con los datos obtenidos en el experimento 2 (véase abajo), los animales fueron sometidos a una operación SHAM, cuando tenían 18 meses de edad (16 meses post-OVX). A los quince días de privación hormonal, se procedió a realizar la lesión cerebral. Una vez sacrificados los animales, las secciones fueron teñidas para el marcador de astrocitos reactivos vimentina y para el de células precursoras de oligodendrocitos (NG2) y finalmente analizadas utilizando la técnica del disector óptico. Para el análisis de las secciones teñidas para la microglía reactiva, se calculó el área de referencia y la proporción de área ocupada por marcaje empleando el método de puntos.

Experimento 2: Se practicó una lesión penetrante a 35 ratas Wistar hembra de 18 meses de edad, 600-700 gramos de peso corporal, ovariectomizadas quince días

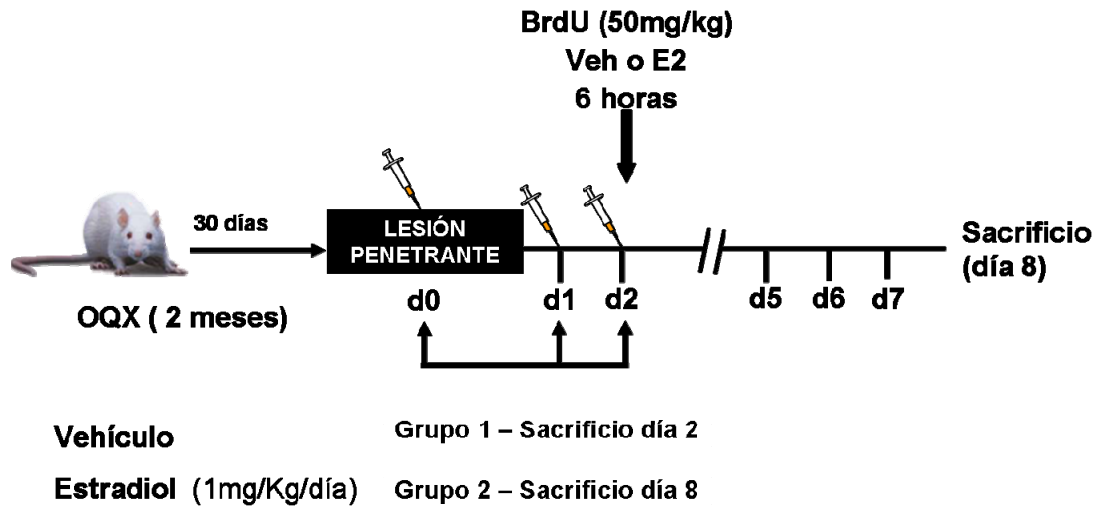
antes de la lesión (OVX 15 días). Inmediatamente después de la lesión, se les aplicó un tratamiento con vehículo, estradiol o los SERMs en los días 0, 1 y 2 (tratamiento temprano). Paralelamente, se les inyectó BrdU (50 mg/Kg/día) en los días 1, 2 y 3 después de la lesión. Los animales fueron sacrificados en el día 8 y las secciones fueron teñidas con los mismos marcadores descritos arriba.

8.3- Expresión de los receptores de estrógenos en las células precursoras de oligodendrocitos, tras lesión penetrante



Se emplearon 8 animales macho Wistar orquidectomizados, lesionados y tratados con vehículo o estradiol en los días 0, 1 y 2 (tratamiento temprano). Las secciones fueron teñidas para NG2 y para el receptor alfa o beta de estrógeno y se analizaron las células que colocalizaban ambos marcadores hasta una distancia de 400 μ m desde el borde de la lesión. Establecimos el porcentaje de células NG2 que expresaban el receptor alfa o beta de estrógeno en relación al número total de células NG2 dentro de la franja de 400 μ m, a partir de fotos tomadas por el microscopio confocal.

8.4- Expresión y proliferación de las células NG2 y astrocitos a lo largo del tiempo después de una lesión penetrante



Diseño Experimental

Se emplearon un total de 16 ratas macho orquidectomizadas a los dos meses de edad, sometidas a una lesión penetrante, tratadas con vehiculo o estradiol en los días 0, 1 y 2 tras la lesión y sacrificadas en el día 2 (2dpl – Grupo 1) o el día 8 (8dpl – Grupo 2). Paralelamente, se les inyectó la hormona o el vehiculo, junto con BrdU (50 mg/Kg/día) en el día 2, 6 horas antes de sacrificar el primer grupo de animales. Las secciones de todos los animales en ese estudio fueron teñidas (triple inmunohistoquímica) para el marcador de proliferación (BrdU), el marcador de células precursoras de oligodendrocitos (NG2) y el marcador de astrocitos maduros (GFAP) o inmaduros (Vimentina).

Para el recuento establecimos el porcentaje de células que expresaban el BrdU y NG2 y GFAP o vimentina a través del análisis de imágenes de CA1 del hipocampo lesionado (el área total es de $150 \mu\text{m}^2$), tomadas en un microscopio confocal. Se tuvo en cuenta el número total de células inmunorreactivas para BrdU y el número de células que expresaban el marcador NG2 y GFAP o vimentina desde el borde de la lesión hasta una distancia de $150 \mu\text{m}$ en el sector CA1 del hipocampo.

Resultados

1- Tipos de células gliales y su distribución, tras la lesión penetrante

En ese experimento realizamos una lesión penetrante en la corteza y el hipocampo dorsal de los animales, sacrificándolos una semana después. La lesión se extendía a través de la corteza frontoparietal y el cuerpo calloso, atravesando en su recorrido dorso-ventral el hipocampo por las regiones CA1 y CA3-CA4.

Esta lesión provocó una gliosis reactiva, con hipertrofia progresiva de los astrocitos, la microglía y las células NG2, que culminaba alrededor del día 7º, con la formación de una cicatriz glial. La cicatriz se extendía aproximadamente unas 500 μm desde el margen de la lesión. En las capas externas de la corteza y el hipocampo, los bordes de la cicatriz transcurrían paralelos a los márgenes de la herida, mientras que en el cuerpo calloso y en el giro dentado, las cicatrices tenían una forma menos regular y se extendían lateralmente hasta distancias mayores.

Los astrocitos mostraban un fenotipo más reactivo y fibroso cuanto más cercanos se encontraban a la cicatriz. La reacción glial también dependía de la proximidad a la cicatriz glial (Figura 14).

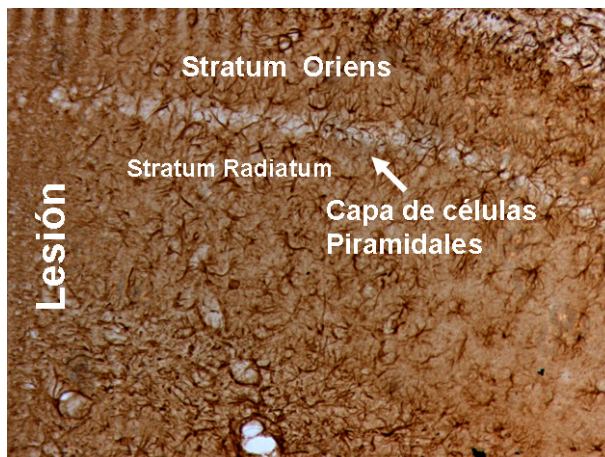


Figura 14. Células inmunorreactivas para vimentina en CA1 de animales orquidectomizados, lesionados y tratados con vehículo en los días 0, 1 y 2 tras la lesión. La imagen demuestra a un intenso marcaje de astrocitos reactivos en el borde de la lesión, formando una densa cicatriz glial, que iba disminuyendo en función de la distancia al borde de la herida.

En los bordes de la herida, además, se encontró microglía ameboide, junto con macrófagos extravasados, más redondeados y sin formas espinosas en la superficie. La localización microglial era esencialmente cercana a la lesión y se veía disminuida con la distancia (Figura 15).

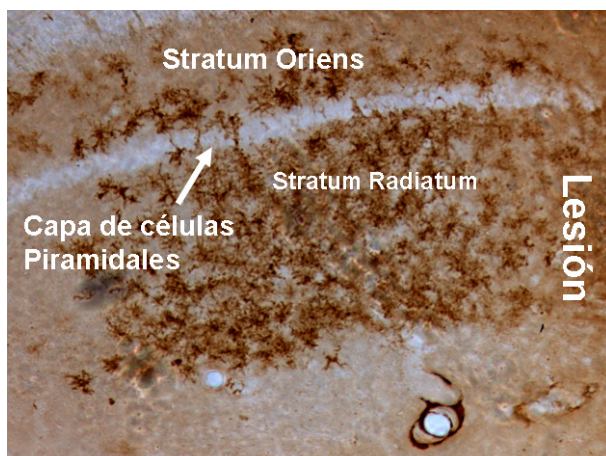


Figura 15. Células inmunorreactivas para microglía en CA1 de ratas orquidectomizadas, lesionadas y tratadas con vehículo en los días 0, 1 y 2 tras la lesión. Se observa un intenso marcaje microglial, predominantemente en el borde de la lesión. Las células presentan una morfología característica de la microglía reactiva: aspecto ameboide, con prolongaciones cortas e hipertrofiadas.

Las células NG2, consideradas como los precursores de oligodendrocitos, tienen una localización dispersa por todo el cerebro. Cuanto más cercana a la lesión, mayor es el número de estas células. En los bordes de la herida se encontraron células hipertrofiadas, con una inmensa red de ramificaciones, muchas de ellas de aspecto reactivo. En los sitios lejanos a la lesión se encontraban también numerosas células NG2, si bien su morfología era algo diferente, con prolongaciones cortas y ramificaciones más delgadas. Además, aparecían más dispersas y su núcleo no era ameboide. Este hecho demuestra que, ante un agente agresor, las células NG2, se activan y se tornan hiperreactivas, tanto más cuanto más cerca estén del lugar dañado (Figura 16).

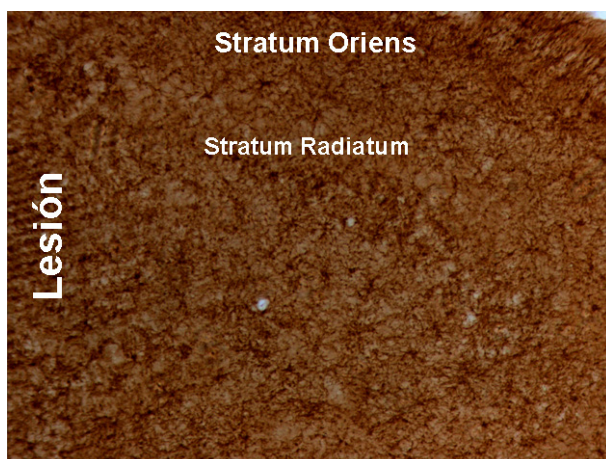


Figura 16. Células inmunorreactivas para NG2 en CA1 de animales orquidectomizados, lesionados y tratados con vehículo en los días 0, 1 y 2 tras la lesión. El patrón de distribución de las células NG2 es bastante difuso. Sin embargo, encontramos a un gran número de estas células en el borde de la lesión.

2- Efecto de los distintos compuestos hormonales sobre la activación y proliferación de la glía reactiva, en ratas jóvenes lesionadas

2.1- Efectos de la testosterona sobre la astroglia y la microglía reactivas

En este estudio hemos determinado el efecto de la testosterona en la astroglia y la microglía reactivas, en ratas macho castradas. Para determinar si los efectos de la testosterona pueden ser mediados por sus metabolitos, algunos animales fueron inyectados con estradiol ó dihidrotestosterona. La inspección cualitativa de las secciones inmunorreactivas para vimentina reveló una cicatriz glial prominente a lo largo del borde de la lesión. Dichas diferencias han sido observadas en los diversos grupos experimentales. En los animales tratados con testosterona o estradiol se observó una cicatriz con una densidad celular más baja en comparación con la de los animales inyectados con el vehículo. Esa diferencia la observamos, tanto con un tratamiento temprano (días 0-2 tras lesión), como con un tratamiento tardío (días 5-7 tras la lesión) (Figura 17).

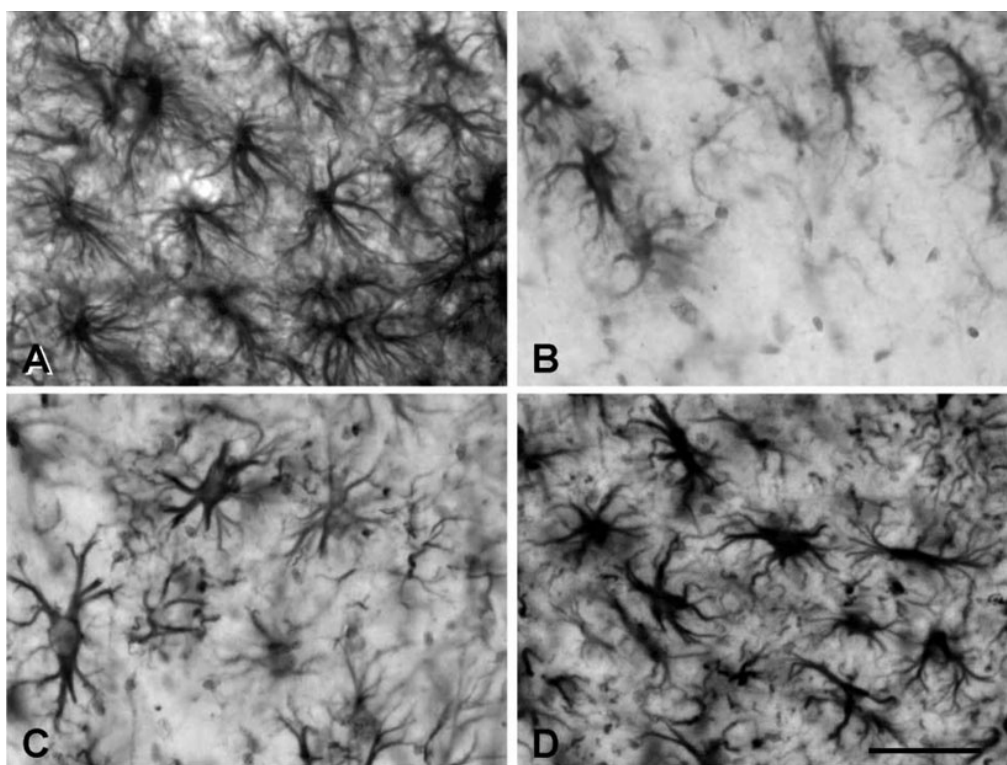


Figura 17. Astrocitos inmunorreactivos para vimentina en el *stratum radiatum* de CA1 hasta una distancia de 100-200 micras desde el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas orquidectomizadas que recibieron un tratamiento temprano con (A) vehículo, (B) testosterona, (C) estradiol o (D) dihidrotestosterona. Escala, 50 μ m.

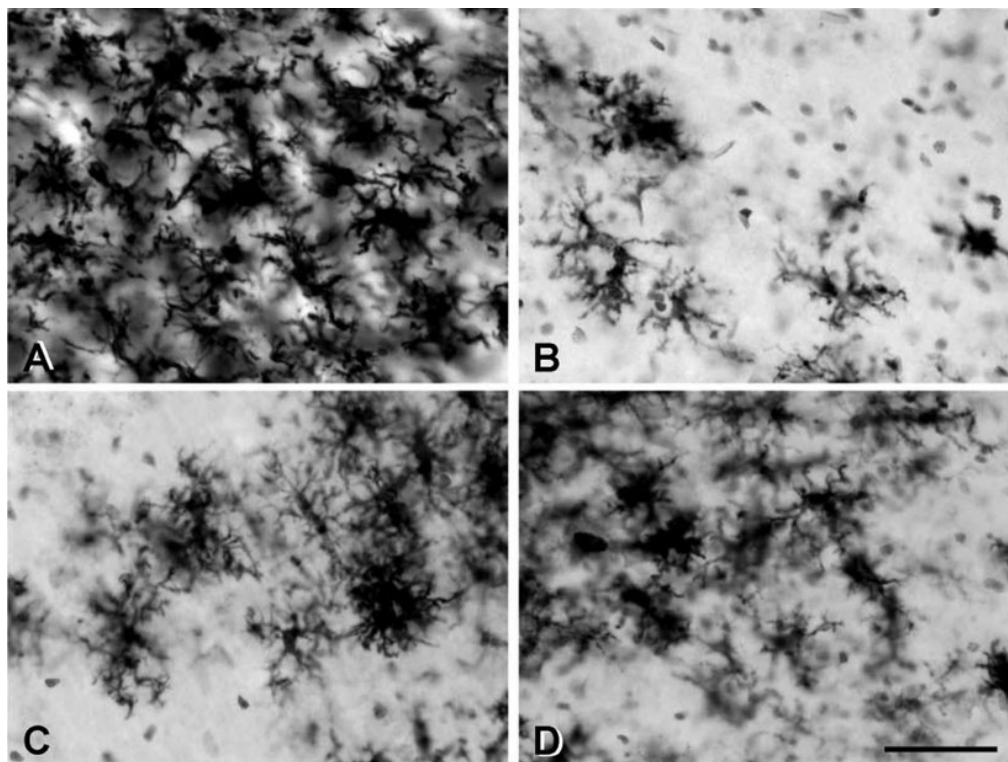


Figura 18. Microglía inmunorreactiva para MHC-II en el *stratum radiatum* de CA1 hasta una distancia de 100-200 μm desde el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas orquidectomizadas que recibieron un tratamiento temprano con (A) vehículo, (B) testosterona, (C) estradiol o (D) dihidrotestosterona. Escala, 50 μm .

El análisis estereológico, con el método del disector óptico, confirmó las observaciones cualitativas. Con ambos tratamientos, temprano y tardío, la administración de testosterona resultó en una disminución significativa del número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina en el área analizada (0-350 micras desde el borde lateral de la lesión). Ambos tratamientos, temprano y tardío, con estradiol, produjeron una disminución del número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina en comparación con los valores del grupo control (vehículo). Sin embargo, ni la administración temprana ni la tardía de dihidrotestosterona afectaron al número de astrocitos positivos para vimentina (Figura 19A, B).

La presencia de células inmunorreactivas para MHC-II a lo largo del borde de la lesión, fue una constante en todos los animales (Figura 18). Observamos una disminución importante en la fracción de volumen de la microglía inmunorreactiva para MHC-II, en los animales que habían recibido un tratamiento, temprano o tardío, con

testosterona o estradiol. Además, la administración temprana de dihidrotestosterona disminuyó considerablemente la fracción de volumen de la microglía inmunorreactiva para MHC-II. Por el contrario, no detectamos ningún cambio en la microglía, cuando se administra tardíamente la dihidrotestosterona (Figuras 19C, D).

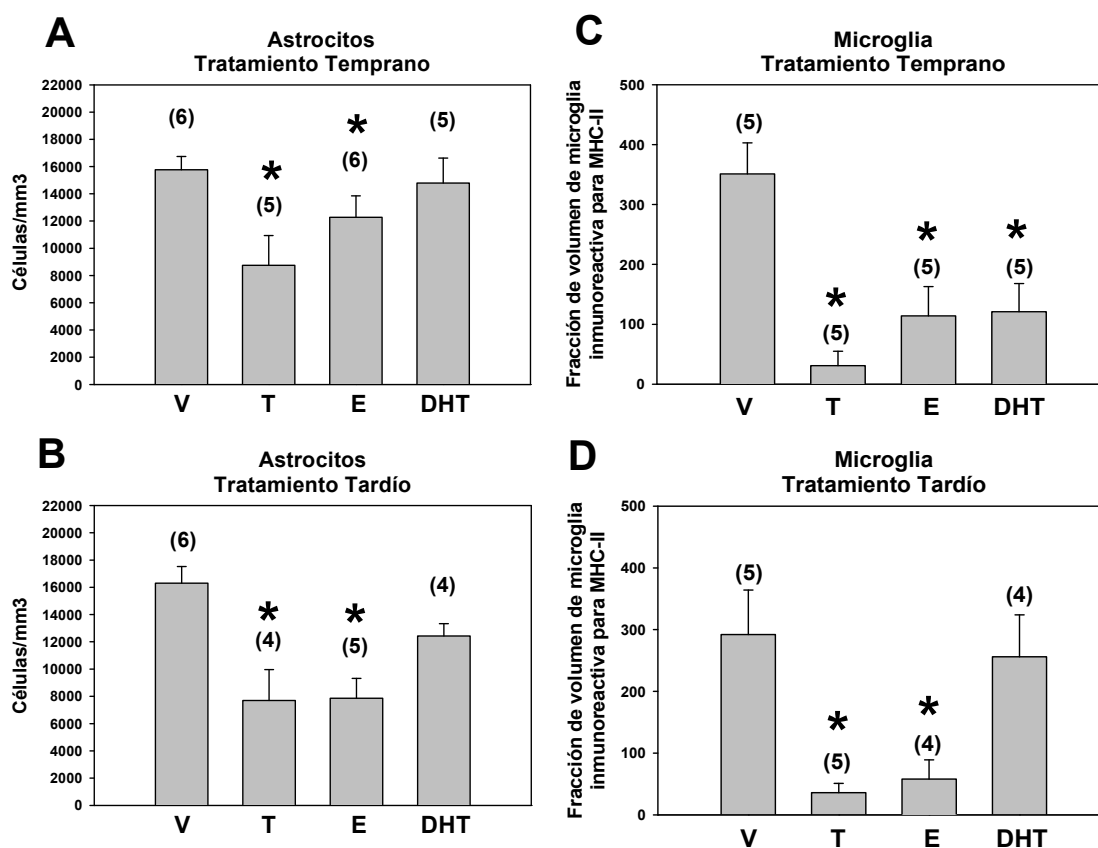


Figura 19. **A, B:** Número de astrocytes inmunorreactivos para vimentina a una distancia de 350 μ m desde el borde lateral de la lesión, en animales machos tratados con vehículo (V), testosterona (T), estradiol (E) y dihidrotestosterona (DHT) en los días 0-2 (A) y 5-7 (B) tras la lesión. **C, D:** fracción de volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II a una distancia de 300 μ m desde el borde lateral de la lesión en animales tratados con vehículo (V), testosterona (T), estradiol (E) o dihidrotestosterona (DHT) en los días 0-2 (C) y días 5-7 (D). El número de animales está indicado en los paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

2.2- Efectos de la testosterona sobre la proliferación de la astroglia reactiva y la microglía reactiva

Para determinar si los efectos de las hormonas en la disminución del número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina y de la fracción de volumen de microglía reactiva para MHC-II, son debidos a una disminución de la proliferación celular, inyectamos BrdU en los días 1-3 tras la lesión penetrante, en ratas macho adultas castradas. Dichos animales fueron sacrificados 8 días después. La inspección cualitativa de las secciones inmunorreactivas para Vimentina+ BrdU+ y MHC-II+ BrdU+ reveló un abundante doble marcaje a lo largo del borde de la lesión (Figuras 20, 21 y 22). La administración temprana de testosterona o estradiol resultó en una disminución del número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina y BrdU en el área analizada (0-400 micras desde el borde lateral de la lesión en CA1). Sin embargo, la administración temprana de DHT no afectó al número de células doblemente marcadas (Figura 23A). Por otra parte, la administración temprana de testosterona tuvo como consecuencia una disminución en el número de células de microglía inmunorreactivas para MHC-II y BrdU. Sin embargo, la administración temprana de estradiol o DHT no produjo ningún cambio en la proliferación de la microglía reactiva, tras la lesión penetrante en el hipocampo (Figura 23B).

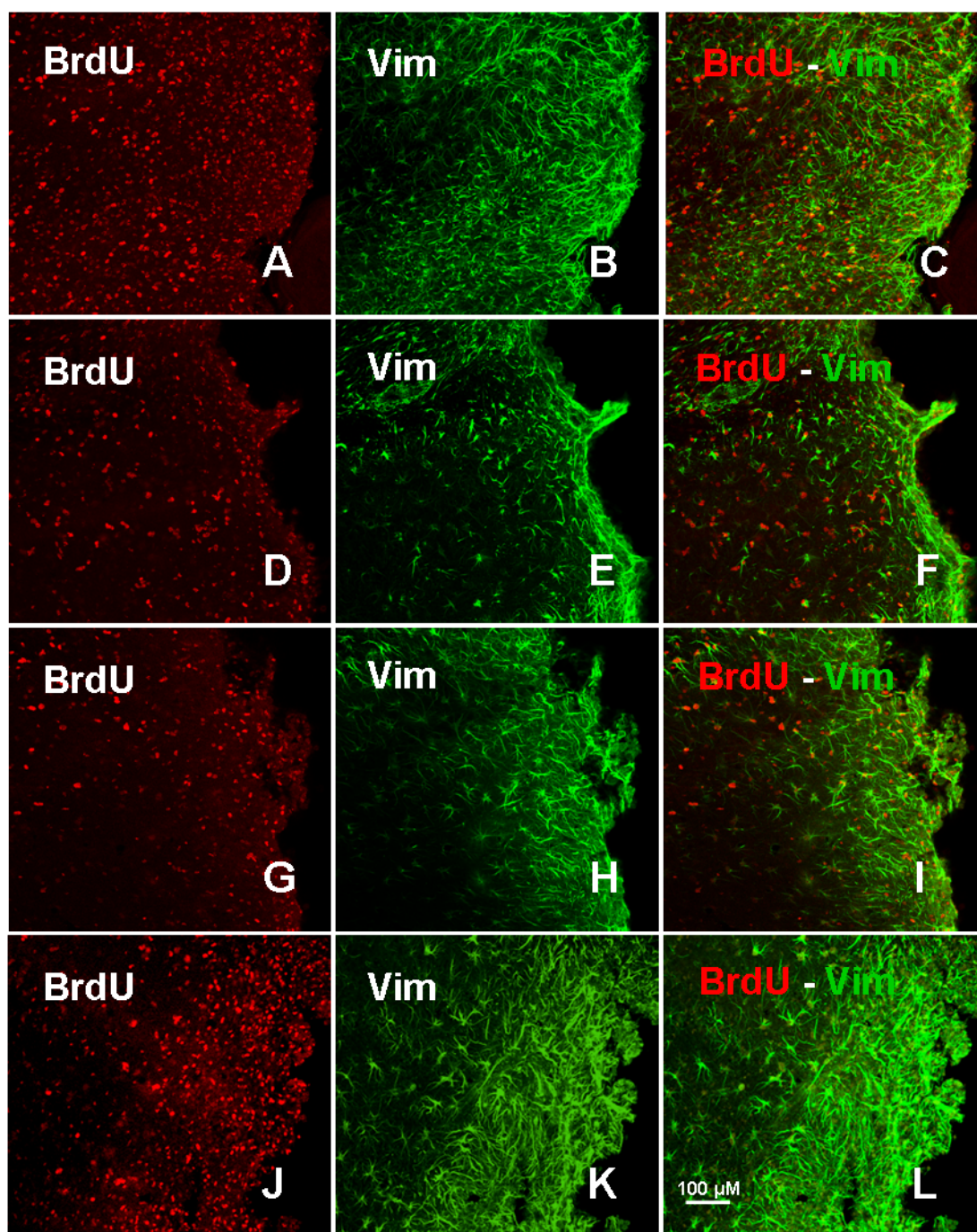


Figura 20. Astrocitos inmunorreactivos para BrdU y vimentina en CA1, en el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas orquidectomizadas tras un tratamiento temprano con (A,B,C) vehículo, (D,E,F) testosterona, (G,H,I) estradiol o (J,K,L) dihidrotestosterona. Escala, 100 μ m.

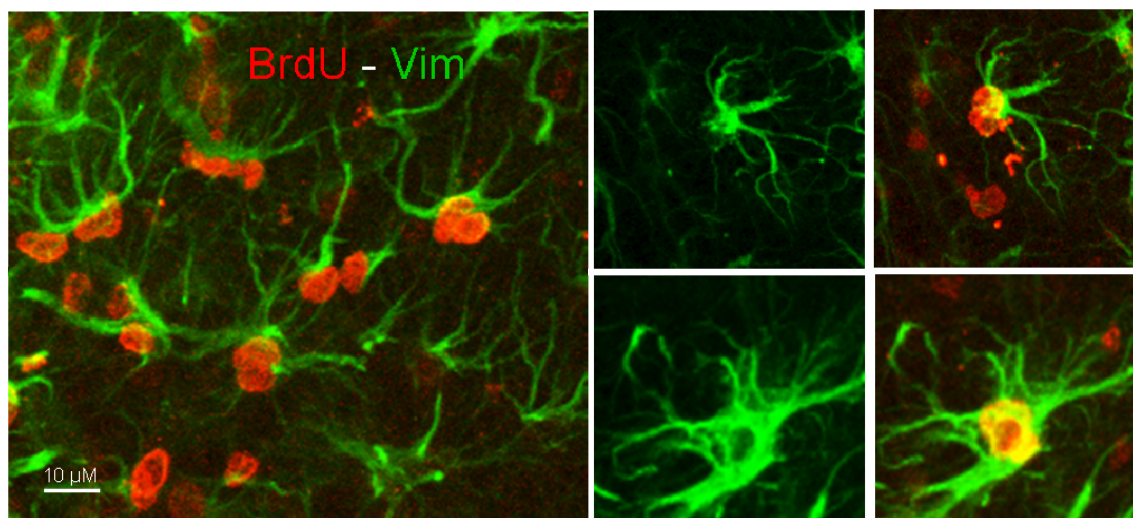


Figura 21. Astrocitos inmunorreactivos para BrdU (rojo) y vimentina (verde) en la zona CA1 del hipocampo de animales tratados con vehículo. Escala, 10 μ m.

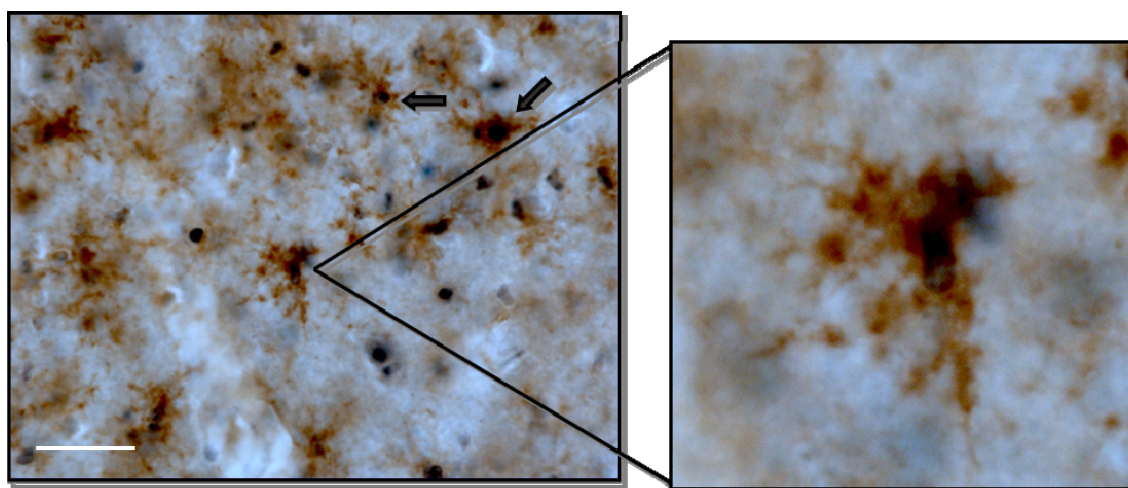


Figura 22. Microglía inmunorreactiva para BrdU (azul) y MHC-II (marrón) en la zona CA1 del hipocampo de animales tratados con vehículo. Escala, 50 μ m.

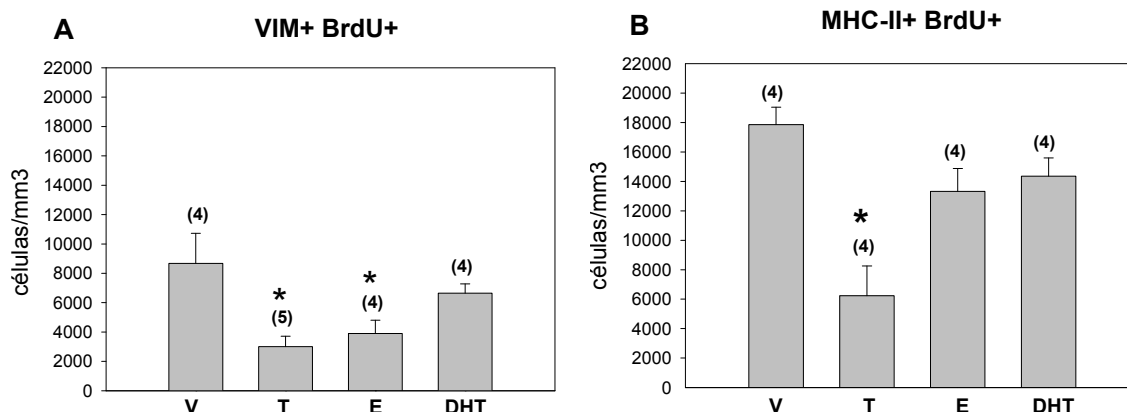


Figura 23. Número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina y BrdU (A) y de células de microglía inmunorreactiva para MHC-II y BrdU, a una distancia de 400 μ m desde el borde lateral de la lesión, en animales machos tratados con vehículo (V), testosterona (T), estradiol (E) o dihidrotestosterona (DHT), en los días 0-2 tras la lesión. El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

2.3- Efectos de la testosterona sobre el fenotipo y la proliferación de las células NG2

En ese estudio hemos analizado el efecto de la testosterona en la población de células precursoras de oligodendrocitos que expresan el proteoglicano NG2, en ratas macho castradas. Para determinar si los efectos de la testosterona pueden ser mediados por sus metabolitos, algunos animales fueron inyectados con estradiol o dihidrotestosterona. La inspección cualitativa de las secciones inmunorreactivas para NG2, reveló una cicatriz glial prominente a lo largo del borde de la lesión. En los animales tratados con testosterona o estradiol, se observó una cicatriz con una densidad celular más baja, en comparación con la de los animales inyectados con el vehículo. Esa diferencia se detectó en los animales tratados en los días 0-2 tras la lesión (tratamiento temprano) (Figura 24).

El análisis estereológico con el método del disector óptico, confirmó las observaciones cualitativas. La administración temprana de testosterona o estradiol, resultó en una disminución significativa del número de células inmunorreactivas para NG2 en el área analizada (0-400 micras desde el borde lateral de la lesión) en comparación con el valor del grupo tratado con el vehículo. Sin embargo, la administración temprana de dihidrotestosterona no tuvo un efecto significativo sobre el número de células positivas para NG2 (Figura 25A).

Para determinar si el efecto hormonal en la población de células precursoras de oligodendrocitos que expresan el proteoglicano NG2 es debido a una disminución de la proliferación celular, inyectamos BrdU en los días 1-3 tras la lesión penetrante, en ratas macho adultas castradas y sacrificadas en el día 8 después de la lesión. La inspección cualitativa de las secciones inmunorreactivas para BrdU + NG2 reveló la presencia de numerosas células con el doble marcaje a lo largo del borde de la lesión (Figura 24). La administración temprana de testosterona o estradiol, resultó en una disminución del número de células inmunorreactivas para BrdU + NG2 en el área analizada (0-400 micras desde el borde lateral de la lesión en CA1). Sin embargo, la administración temprana de DHT no tuvo un efecto significativo en el número de células con el doble marcaje (Figura 25B).

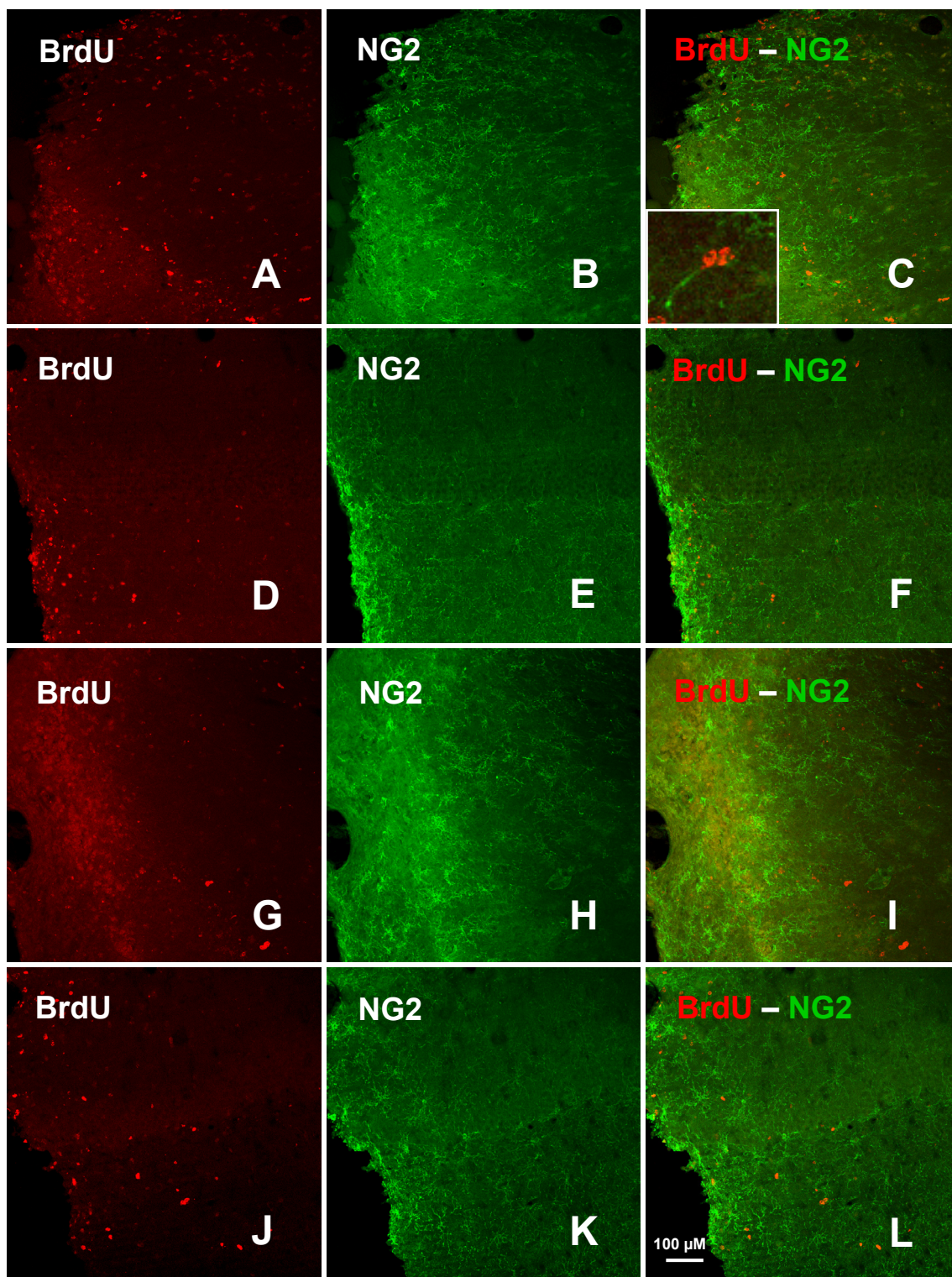


Figura 24. Células precursoras de oligodendrocitos inmunorreactivas para BrdU y NG2, en la zona CA1 del hipocampo y en el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas orquitectomizadas, tras el tratamiento temprano con (A,B,C) vehículo, (D,E,F) testosterona, (G,H,I) estradiol o (J,K,L) dihidrotestosterona. Escala, 100 μ m.

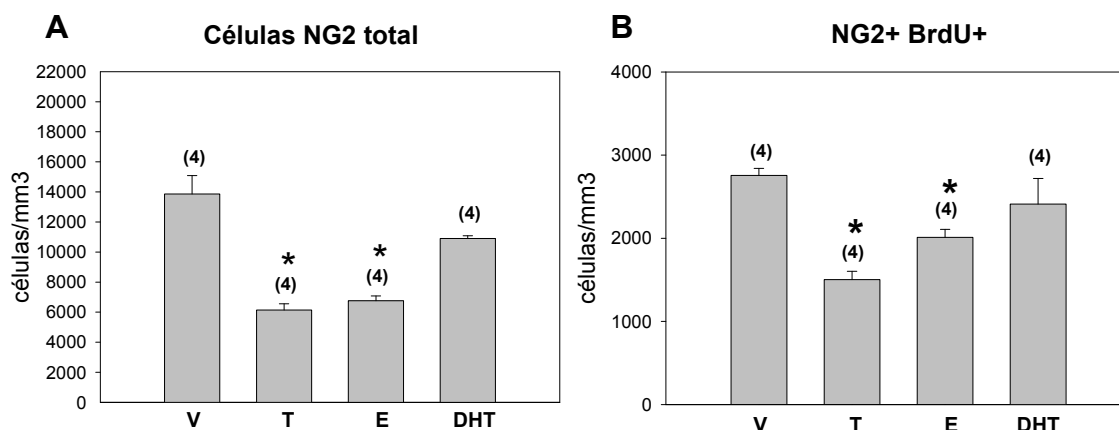


Figura 25. Número de células precursoras de oligodendrocitos, inmunorreactivas para NG2 (A) y NG2+ BrdU+ (B) a una distancia de 400 μ m desde el borde lateral de la lesión en animales machos tratados con vehículo (V), testosterona (T), estradiol (E) o dihidrotestosterona (DHT), en los días 0-2 tras la lesión. El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

2.4- Tratamiento temprano con los SERMs y agonistas de los receptores de estrógeno

En este experimento hemos estudiado el efecto de diferentes compuestos estrogénicos sobre la astroglia y la microglía reactivas, en ratas hembra ovariectomizadas. En un examen visual pudimos observar una cicatriz glial prominente a lo largo del borde de la lesión. Los astrocitos mostraban un fenotipo más reactivo y fibroso, cuanto más cercanos se encontraban a la cicatriz, y el marcaje con vimentina presentaba un descenso gradual, conforme nos alejábamos de la lesión. La microglía presentaba una morfología ameboide en los bordes de la herida, mientras que el fenotipo arbustivo o ramificado se encontraba fuera de la cicatriz, en el parénquima, entre astrocitos reactivos no cicatriciales. Se observaron diferencias cualitativas entre los distintos grupos experimentales: los animales tratados con compuestos estrogénicos presentaban una cicatriz glial con una menor densidad celular que los animales control inyectados con vehículo (Figura 26).

2.4.1- Efecto en la activación astrogliar

El análisis estereológico con el método del disector óptico confirmó las observaciones cualitativas en la astroglia. Todos los tratamientos realizados dieron lugar a una reducción significativa en el número de astrocitos inmunorreactivos para

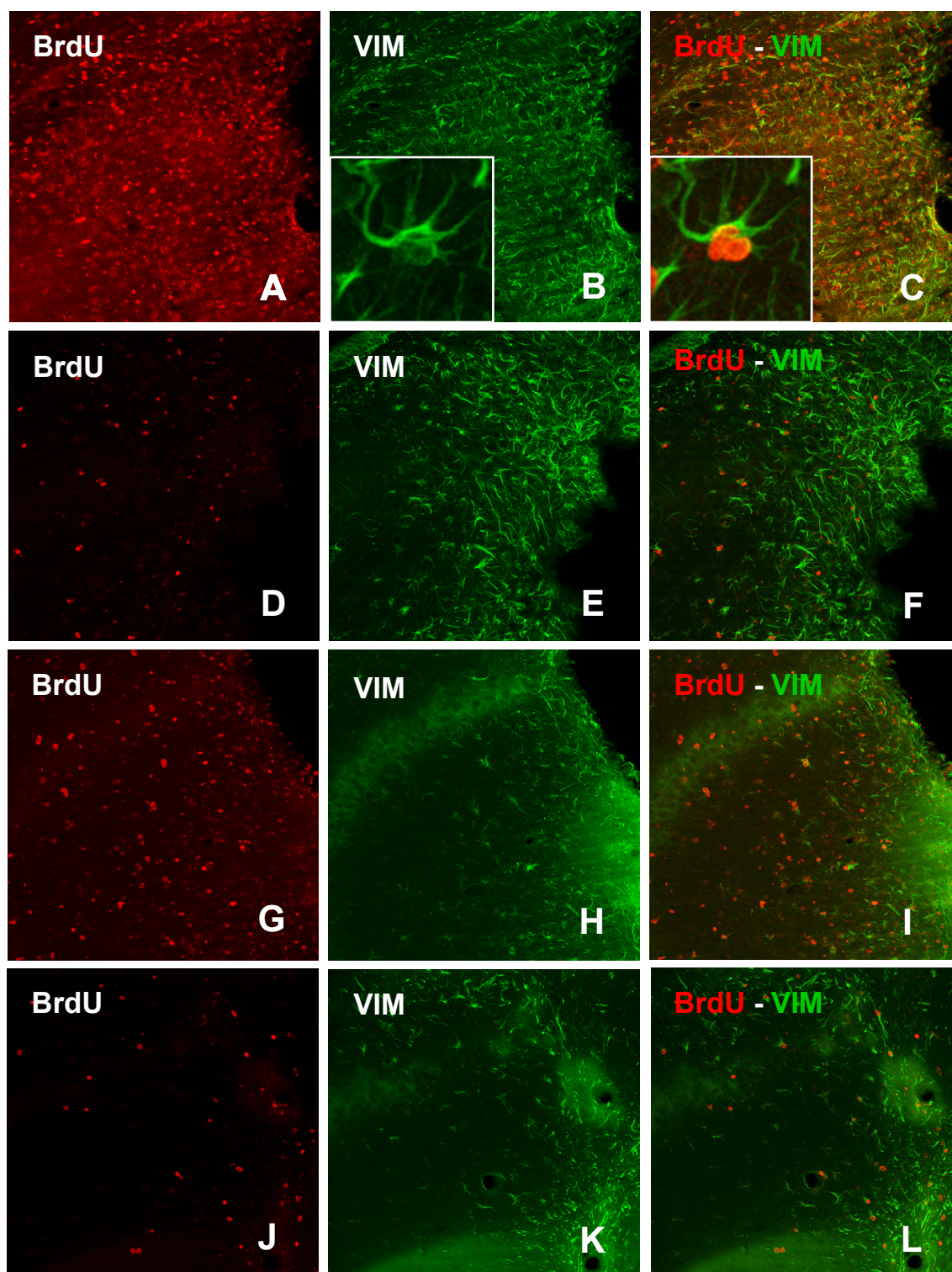
vimentina, en el área estudiada (0-350 micras desde el borde de la lesión), en comparación con los valores del grupo control. Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con estradiol y el resto de tratamientos, ni entre estos últimos. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con el agonista del receptor alfa de estrógenos (PPT), el beta (DPN), o la combinación de ambos (Figura 27A).

2.4.2- Efecto en la activación microglial

El análisis de la microglía por medio de la técnica de conteo por puntos confirmó en parte las observaciones del examen visual. El tratamiento de los animales con estradiol, raloxifeno, tamoxifeno o PPT o una combinación de los agonistas para los receptores estrogénicos (PPT+DPN), produjo un descenso significativo en el número de células inmunorreactivas para MHC-II, en relación a los animales inyectados con vehículo. Sin embargo, el tratamiento con DPN no se tradujo en diferencias estadísticamente significativas (Figura 27C).

2.4.3- Efecto de los tratamientos sobre la proliferación glial

En el estudio anterior, observamos que los SERMs y los ligandos específicos de los receptores de estrógeno ejercían un efecto sobre la glía reactiva. En base a esto, nos preguntamos si la administración temprana de dichos compuestos pudiera afectar también a la proliferación celular. Según se ve en la figura 27B, tanto los SERMS, como los ligandos específicos de los receptores de estrógeno, DPN y PPT, disminuyen la proliferación astrocitaria tras una lesión. Por el contrario, la proliferación de la microglía reactiva, en ese estudio, no se ve alterada. Los SERMs, el DPN y el PPT no provocan ningún cambio en la proliferación aunque reducen la reactividad microglial tras la lesión (Figura 27D).



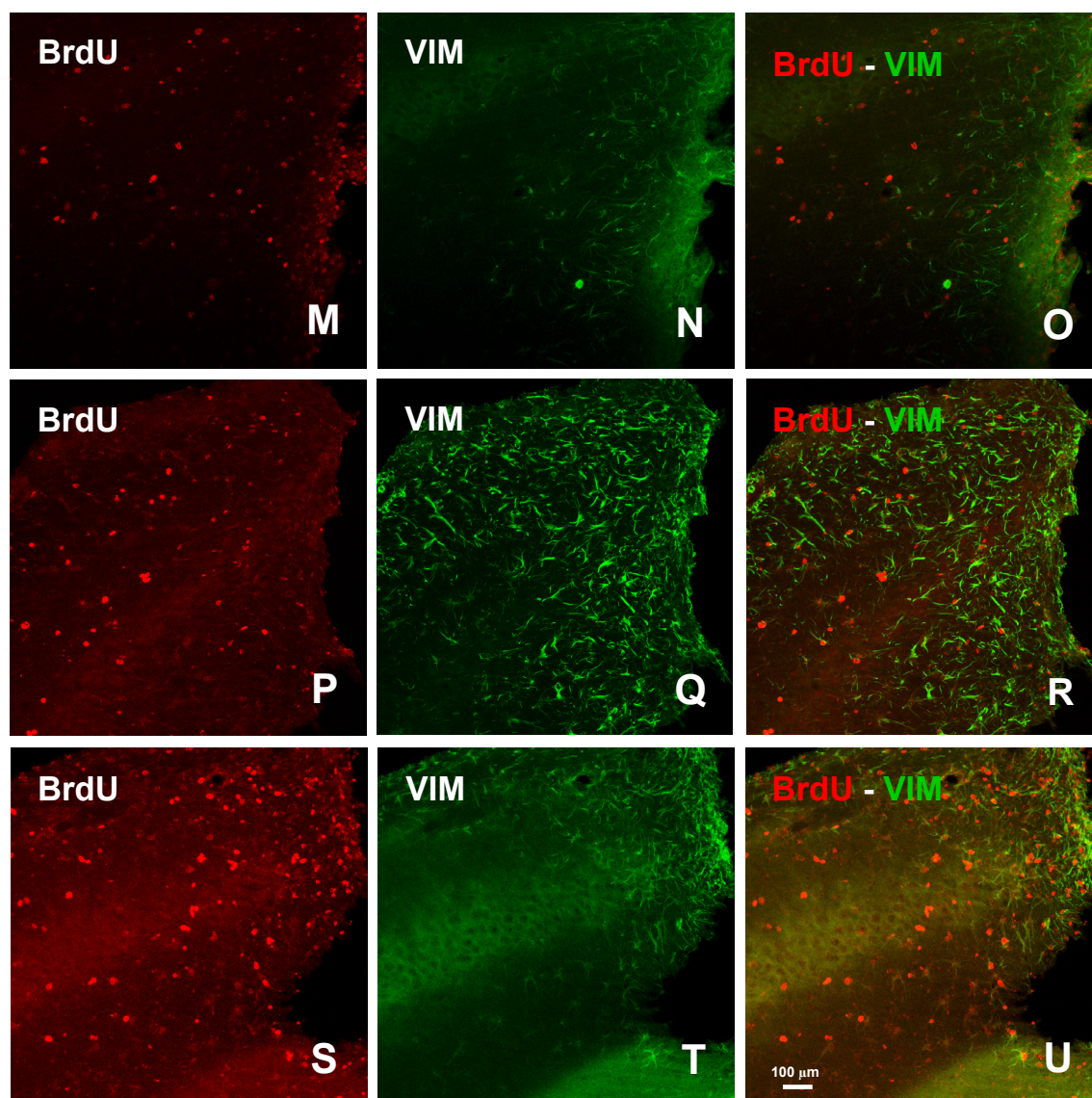


Figura 26. Astrocytos inmunorreactivos para BrdU y vimentina en CA1, en el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas ovariectomizadas tras un tratamiento temprano con (A,B,C) vehículo, (D,E,F) estradiol, (G,H,I) raloxifeno, (J,K,L) tamoxifeno, (M,N,O) DPN, (P,Q,R) PPT y (S,T,U) DPN + PPT. Escala, 100 μ m.

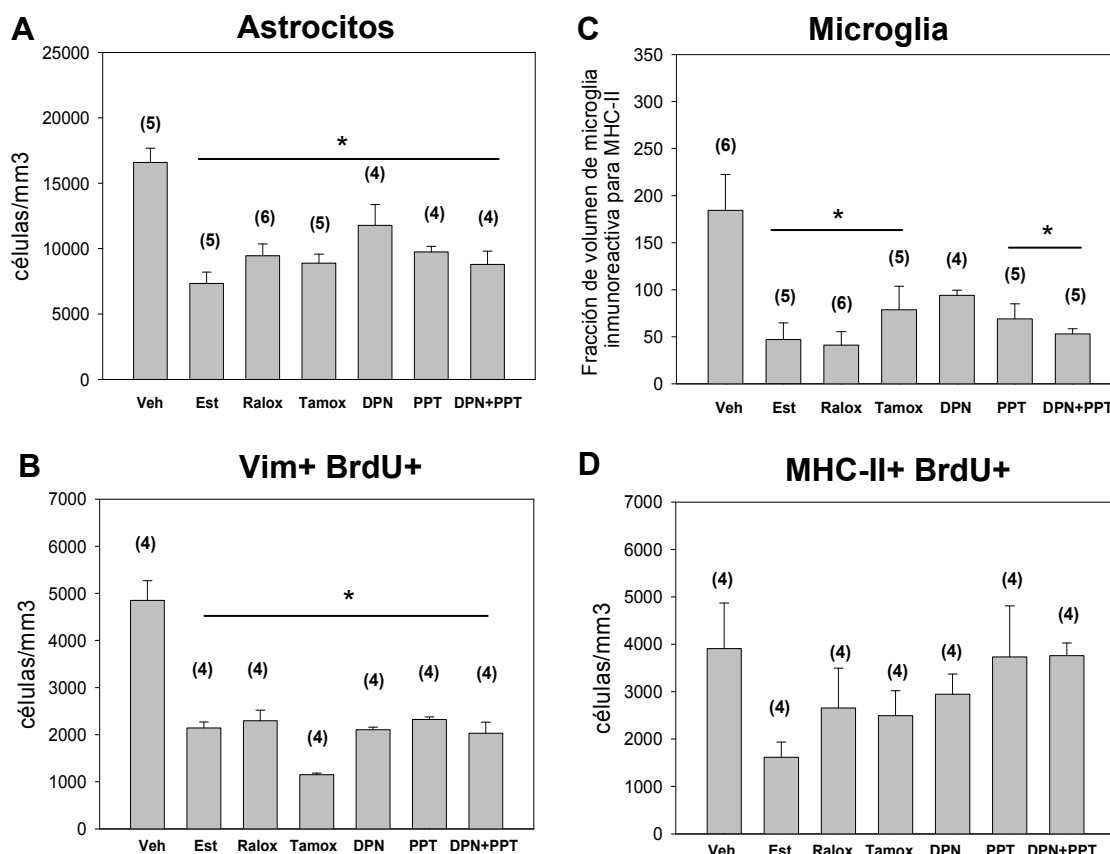


Figura 27. Células inmunorreactivas para vimentina (A) a una distancia de 350 μ m desde el borde lateral de la lesión en el hipocampo y astrocitos inmunorreactivos para Vim+ BrdU+ (B) a una distancia de 400 μ m, en CA1 de animales hembra tratados con vehículo (V), estradiol (E), raloxifeno (Ralox), tamoxifeno (Tamox), DPN, PPT y DPN+PPT, en los días 0-2 tras la lesión. La gráfica C representa la fracción de volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II, a una distancia de 300 μ m desde el borde lateral de la lesión en animales sometidos al mismo tratamiento. En D se representan las células de microglía que coexpresan BrdU. El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

2.4.4- Efecto sobre el fenotipo y la proliferación de las células NG2

Para ese estudio, nos planteamos saber si las células NG2 podrían verse afectadas por el tratamiento con los SERMs, el raloxifeno, el tamoxifeno y los ligandos selectivos de los receptores de estrógeno, DPN y PPT. El análisis morfológico no difiere sensiblemente del realizado en el estudio anterior, sobre el efecto de la testosterona en las células NG2 y su proliferación tras una lesión. El recuento total de las células NG2 nos ha demostrado que el estradiol y los SERMs disminuyen el

número de células NG2 hasta una distancia de 350 micras desde el borde lateral de la lesión. A la vista de los resultados obtenidos tras el tratamiento con PPT (Figura 28A), parece que el receptor alfa de estrógeno está implicado en dicha acción. Aparte de los efectos en la expresión fenotípica de las células NG2, quisimos determinar si dichos compuestos podrían regular la proliferación temprana de las células NG2. Así, pudimos comprobar que el estradiol, los SERMs y los ligandos de los receptores de estrógenos reducen significativamente la proliferación de las células NG2 tras una lesión penetrante (Figura 28B).

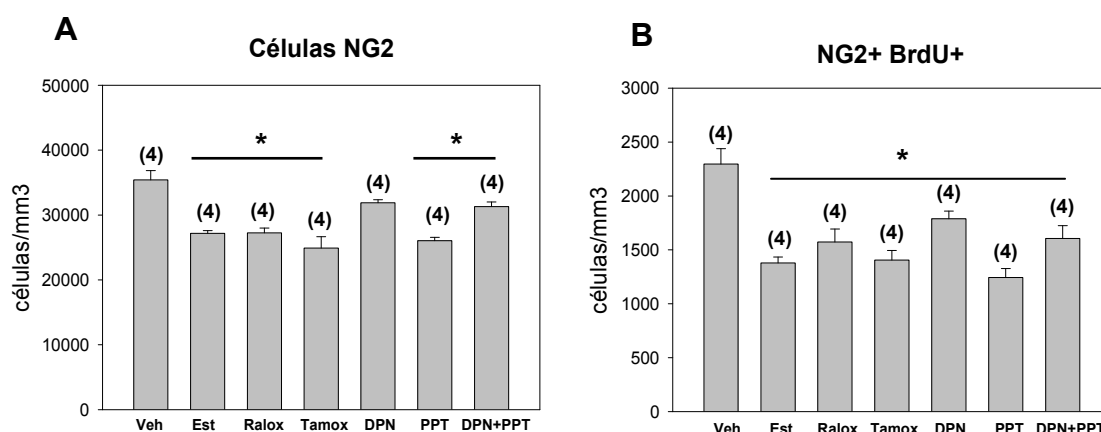


Figura 28. Número de células precursoras de oligodendrocitos inmunorreactivas para NG2 (A) y células que colocalizaban los marcadores para NG2 y BrdU (B) a una distancia de 400 μ m desde el borde lateral de la lesión, en animales hembra tratados con vehículo (Veh), estradiol (Est), raloxifeno (Ralox), Tamoxifeno (Tamox), DPN, PPT o DPN + PPT en los días 0-2 tras lesión. El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

2.5- Tratamiento tardío con los SERMs y agonistas de los receptores de estrógenos

Una vez demostrado el efecto de los SERMs y los ligandos específicos de los receptores de estrógenos en la activación celular y en el desarrollo temprano de la cicatriz glial, quisimos ver qué podría ocurrir en los siguientes días después de la lesión, cuando dicha cicatriz está ya conformada. Para ello, se procedió a realizar un tratamiento tardío, en los días 5, 6 y 7 tras la lesión.

2.5.1- Efecto sobre los astrocitos reactivos

En la cicatriz glial, que se extendía a lo largo de los bordes de la lesión, pudimos observar que los astrocitos reactivos aparecían hipertrofiados y más fibrosos, con una marcada sobre-expresión de vimentina. El marcaje de vimentina disminuía gradualmente con la distancia a la lesión. En los animales tratados con estradiol, la cicatriz presentaba una densidad celular más baja, comparada con la de los animales inyectados con el vehículo (Figura 29).

El análisis estereológico con el método del disector óptico confirmó las observaciones cualitativas. La administración tardía de estradiol y tamoxifeno resultó en una disminución significativa en el número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina en el área estudiada (0-350 μ m del borde lateral de la lesión), comparando con los valores control. En cambio, la administración tardía de raloxifeno no afectó al número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre el tratamiento simultáneo con PPT y DPN y los tratamientos con sólo PPT o sólo DPN (Figura 31A).

2.5.2- Efectos en la microglía reactiva

Las células inmunorreactivas para MHC-II fueron observadas en todos los animales a lo largo del borde de la lesión (Figura 30), apreciándose una disminución notable de éstas en los animales tratados con estradiol. El análisis mediante el método de conteo por puntos, confirmó en parte las observaciones cualitativas. La fracción del volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II mostró un descenso significativo en los animales que recibieron tanto estradiol como tamoxifeno, raloxifeno o DPN, en comparación con los valores de las ratas control, que fueron inyectadas con vehículo (Figura 31B). Estadísticamente, esta diferencia no se observó al tratarlos con PPT o la combinación de los agonistas para los receptores de estrógenos.

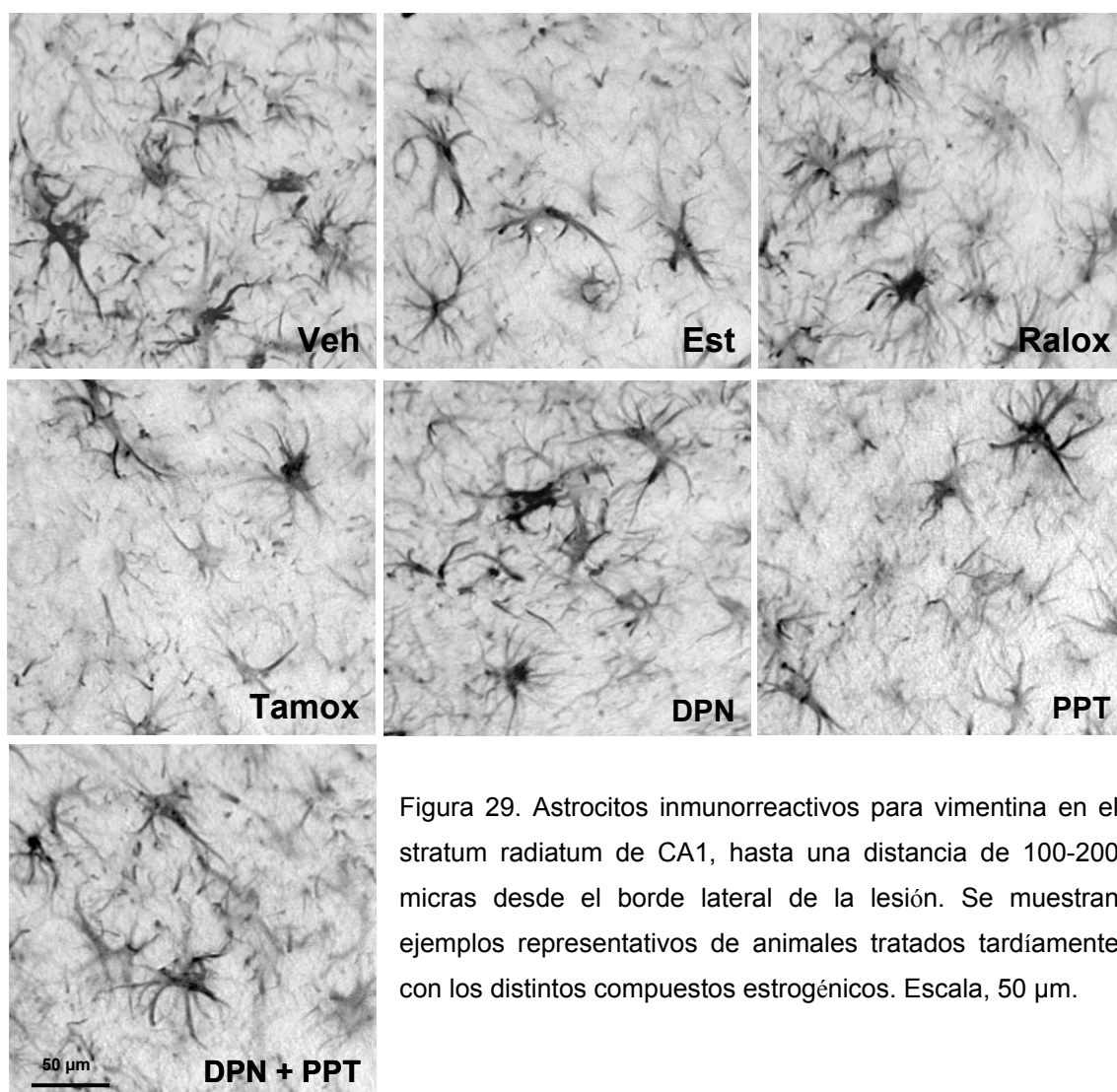


Figura 29. Astrocitos inmunorreactivos para vimentina en el stratum radiatum de CA1, hasta una distancia de 100-200 micras desde el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de animales tratados tardíamente con los distintos compuestos estrogénicos. Escala, 50 μ m.

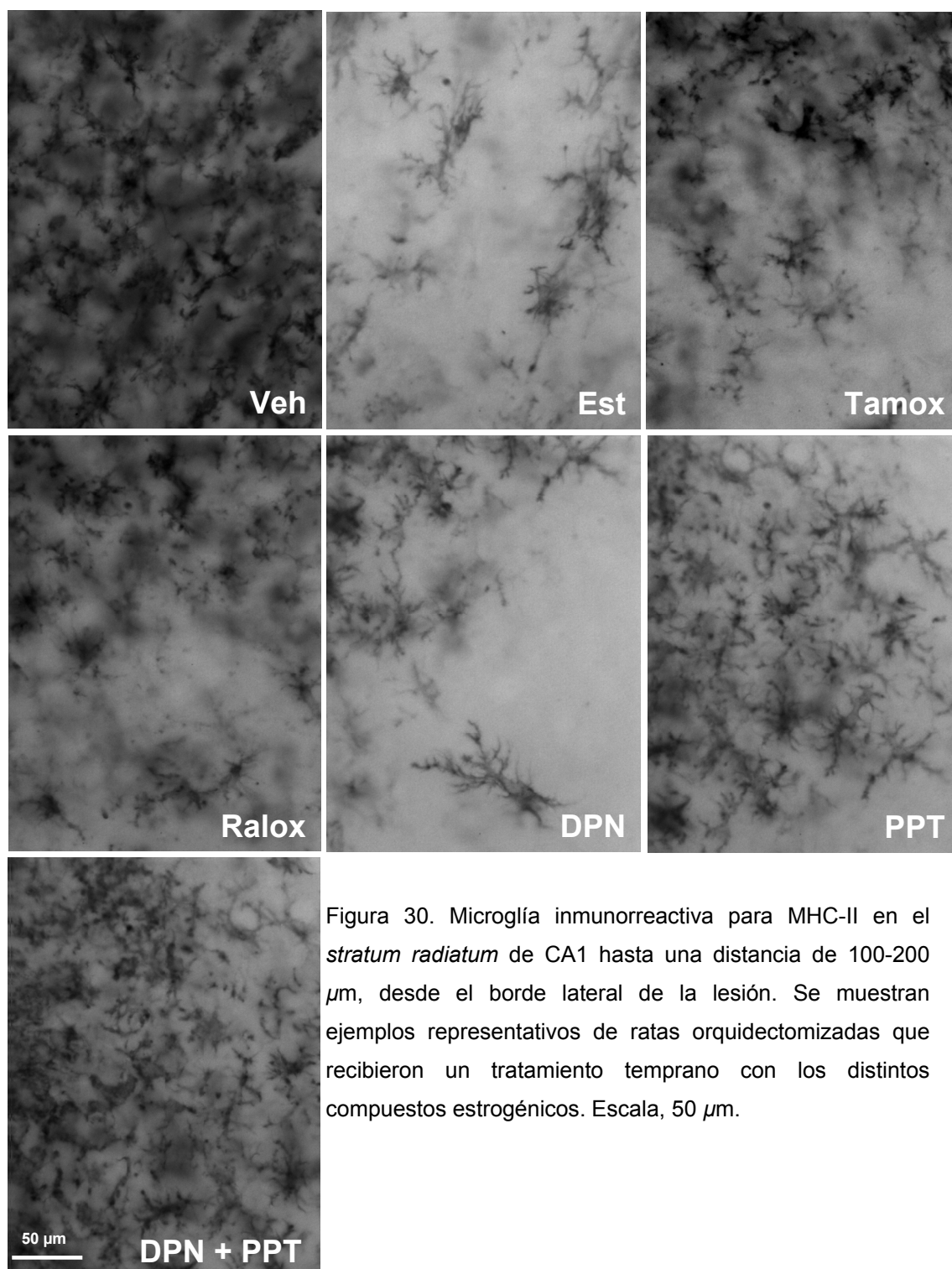


Figura 30. Microglía inmunorreactiva para MHC-II en el *stratum radiatum* de CA1 hasta una distancia de 100-200 μm , desde el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas orquidectomizadas que recibieron un tratamiento temprano con los distintos compuestos estrogénicos. Escala, 50 μm .

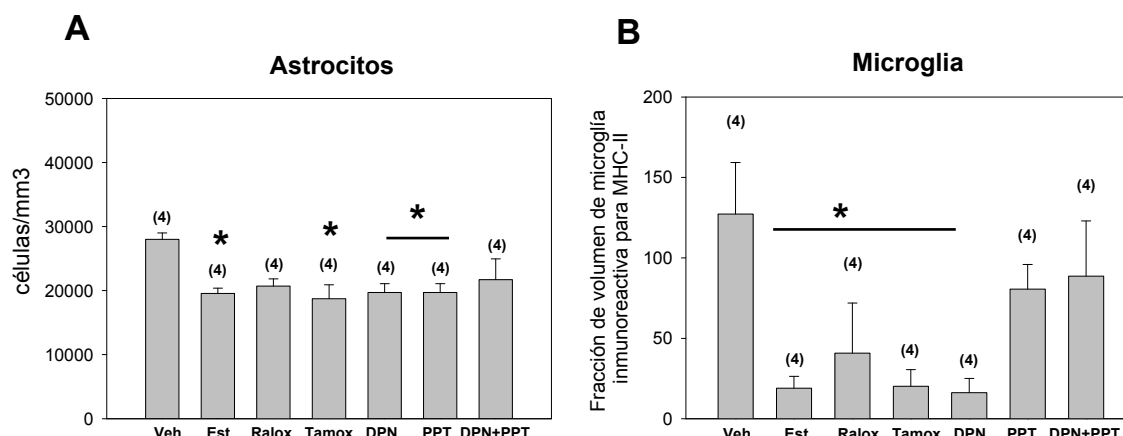


Figura 31. (A) Células inmunorreactivas para vimentina a una distancia de 350 μ m desde el borde lateral de la lesión en hipocampo y (B) fracción de volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II, a una distancia de 300 μ m desde el borde lateral de la lesión, en animales macho tratados con vehículo (Veh), estradiol (Est), raloxifeno (Ralox), tamoxifeno (Tamox), DPN, PPT y DPN+PPT, en los días 5-7 tras la lesión. El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

2.5.3- Efecto sobre las células NG2

La inspección cualitativa de las secciones inmunorreactivas para NG2 reveló una cicatriz glial prominente a lo largo del borde de la lesión. En los animales tratados con estradiol se ha observado una cicatriz con una densidad celular más baja que la de animales inyectados con vehículo (Figura 32). El análisis estereológico, con el método del disector óptico, nos permitió confirmar las observaciones cualitativas. El tratamiento con estradiol, tamoxifeno y raloxifeno reveló un descenso significativo del número de células inmunorreactivas para NG2 con respecto al control (Figura 34A). No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con DPN, PPT y el combinado de ambos agonistas, ejerciendo todos ellos también una reducción significativa en el número de células inmunorreactivas. En relación a la proliferación de células NG2 tras la lesión, observamos también una intensa aglomeración de células teñidas para la BrdU y NG2 (Figura 33). Al emplear tardíamente el tratamiento con tamoxifeno, el DPN, el PPT y el combinado de ambos, se produjo un descenso significativo de las células NG2 marcadas con BrdU (Figura 34B).

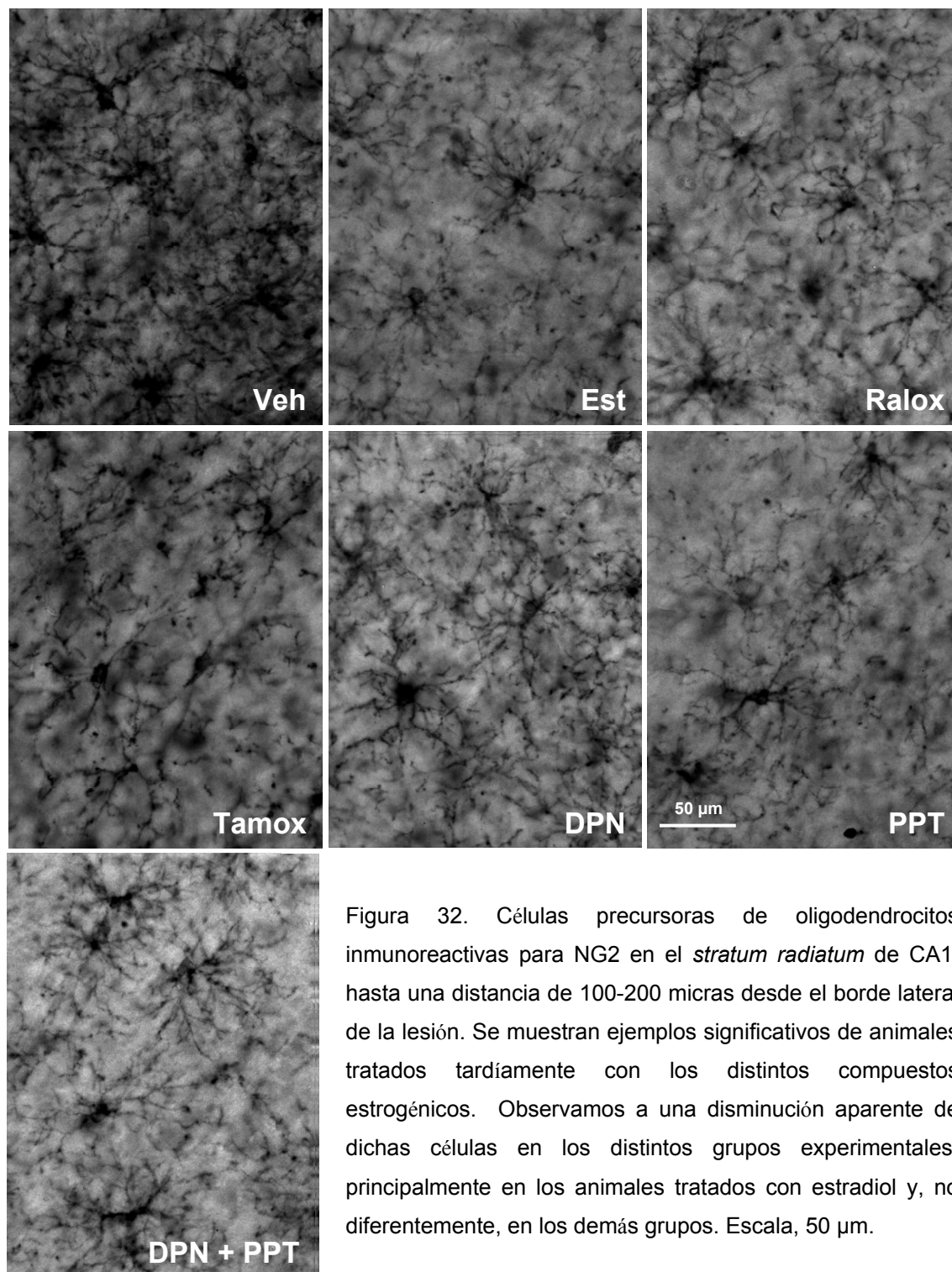


Figura 32. Células precursoras de oligodendrocitos inmunoreactivas para NG2 en el *stratum radiatum* de CA1, hasta una distancia de 100-200 micras desde el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos significativos de animales tratados tardíamente con los distintos compuestos estrogénicos. Observamos a una disminución aparente de dichas células en los distintos grupos experimentales, principalmente en los animales tratados con estradiol y, no diferentemente, en los demás grupos. Escala, 50 μ m.

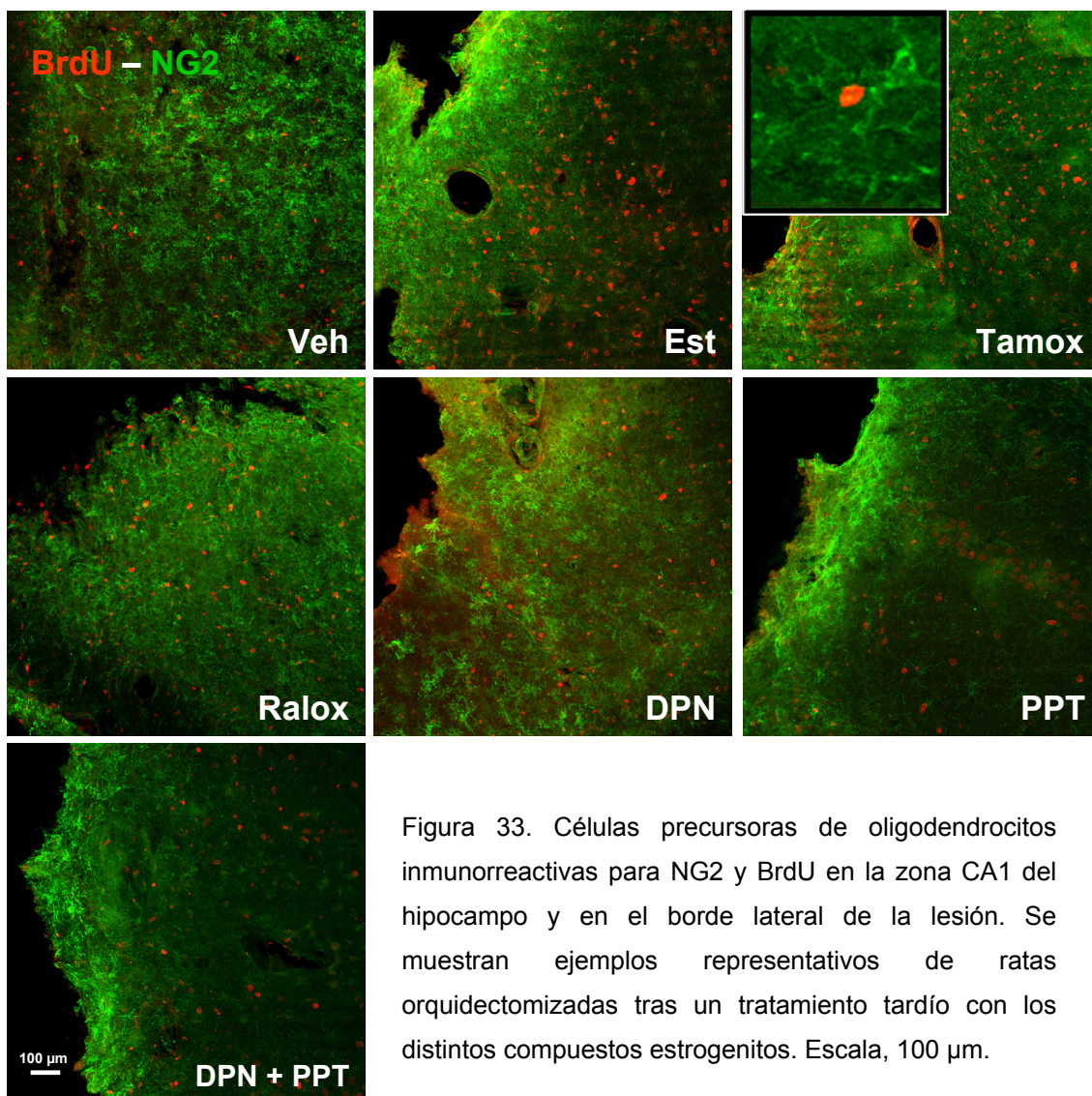


Figura 33. Células precursoras de oligodendrocitos inmunorreactivas para NG2 y BrdU en la zona CA1 del hipocampo y en el borde lateral de la lesión. Se muestran ejemplos representativos de ratas orquidectomizadas tras un tratamiento tardío con los distintos compuestos estrogenitos. Escala, 100 μ m.

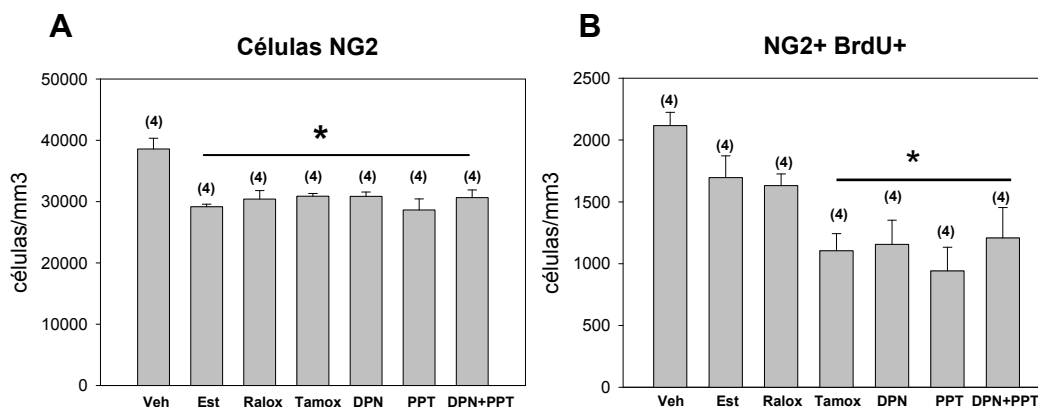


Figura 34. Células precursoras de oligodendrocitos, inmunorreactivas para NG2 (A) a una distancia de 350 μ m desde el borde lateral de la lesión. En (B) se representa el número de células NG2 que expresaban la BrdU, en una franja de 400 micras de distancia desde la lesión en CA1 del hipocampo, en animales macho tratados con vehículo (V), estradiol (E), raloxifeno (Ralox), tamoxifeno (Tamox), DPN, PPT y DPN+PPT en los días 5-7, tras la lesión. El número de animales está indicado en los paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

3- Efecto del tratamiento temprano con los SERMs sobre la glía reactiva, en ratas viejas lesionadas

En este estudio sobre el efecto de los SERMs raloxifeno, tamoxifeno, basedoxifeno y ospemifeno, en la respuesta glial tras una lesión, hemos empleado ratas viejas (18 meses y dos semanas de edad) que fueron previamente ovariectomizadas (OVX) a diferentes edades. El grupo que denominamos “OVX 15 días” estaba integrado por ratas ovariectomizadas a los 18 meses de edad, que fueron sometidas a la lesión penetrante dos semanas después. Estos animales estuvieron, por tanto, privados de hormonas gonadales durante 15 días, es decir, el intervalo entre la gonadectomía y la lesión. En el grupo que denominamos “OVX 16 meses”, las ratas se ovariectomizaron con dos meses de edad, por lo que estuvieron 16 meses y medio privadas de hormonas gonadales. Con el fin de atenuar posibles diferencias debidas a la operación en sí, los animales de este último grupo (OVX 16 meses) fueron sometidos a un simulacro de ovariectomía (SHAM) dos semanas antes de la lesión; de esta manera se equipara al grupo OVX 15 días. En el análisis de las secciones teñidas para los distintos marcadores gliales (vimentina, MHC-II y NG2), se observó un intenso aglomerado celular cercano al borde de la lesión, de aspecto ameboideo con prolongaciones hiperplásicas. Cuanto más se alejaba de la herida, más células gliales

se encontraban en estado de reposo, emitiendo pocas prolongaciones y ramificaciones más delgadas. Además, se observó que el grupo de animales OVX 16 meses presentaba una mayor reactividad glial comparada con el grupo de animales ovariectomizados 15 días antes a la lesión. Para confirmar esas observaciones cualitativas, realizamos recuentos estereológicos de las secciones teñidas para el marcador astrocitario, vimentina, para el de microglía reactiva, MHC-II, y para el de las células precursoras de oligodendrocitos, NG2.

3.1- Efecto sobre los astrocitos reactivos

Los astrocitos reactivos se encontraban totalmente dispersos por el hipocampo lesionado, siendo más aparentes en el borde de la lesión, hasta 500 micras de distancia. Hemos hecho un recuento de células reactivas desde el borde de la herida hasta 350 micras en el hipocampo. La lesión inducía a un aumento de la expresión de vimentina en la franja estudiada y en todos los grupos experimentales, siendo más prominente en los animales tratados con vehículo (Figura 35A, B).

Después de la lesión penetrante, observamos que, tanto el estradiol, como los SERMs, disminuían el número de células inmunorreactivas para vimentina en la franja de tejido entre 0 y 350 micras desde el borde de la lesión. Tanto en los animales OVX 15 días como en los OVX 16 meses, la diferencia resultaba estadísticamente significativa (ANOVA una vía con post-hoc TUKEY; $P < 0,05$) (Figura 35A, B).

Al evaluar la respuesta astrogliar frente al tratamiento y el tiempo de ovariectomía (Figura 35C), observamos que el tiempo de privación hormonal influye en la respuesta de la activación astrocitaria a los tratamientos con vehículo, estradiol, bazedoxifeno u ospemifeno.

3.2- Efecto en la activación microglial

Al evaluar la respuesta microglial frente a la lesión, encontramos diferencias en todos los grupos experimentales. Medimos el grado de activación microglial fijándonos en la expresión de MHC-II. La cuantificación del área hipocampal ocupada por microglía MHC-II positiva mostraba una importante reducción entre los animales OVX 15 días, tratados con estradiol, raloxifeno, tamoxifeno, bazedoxifeno o bien con ospemifeno, respecto a los inyectados con vehículo (Figura 36A). Adicionalmente, hemos estudiado la reactividad microglial en animales de 18 meses de edad y

ovariectomizados a los 2 meses, empleando los mismos tratamientos del experimento anterior. El objetivo ha sido evaluar si con un periodo mayor de privación hormonal los tratamientos estrogénicos pueden tener un efecto sobre la microglía reactiva. En este caso (OVX 16 meses), el marcaje microglial se ve significativamente disminuido en los animales tratados con estradiol, raloxifeno, tamoxifeno, bazedoxifeno u ospemifeno, respecto al control con vehículo (Figura 36B). Además, observamos que en los animales tratados con vehículo o con ospemifeno, hay un efecto del tiempo de ovariectomía versus el tratamiento (Figura 36C).

3.3- Efecto sobre las células NG2

Observamos en experimentos anteriores (en ratas jóvenes) que los SERMs reducen el número y proliferación de las células NG2 en hipocampo lesionado. Con ese estudio, nos preguntamos si las células NG2 de ratas viejas lesionadas y que fueron previamente ovariectomizadas a distintos tiempos (OVX 15 días y OVX 16 meses) antes de la lesión, son sensibles al efecto de los compuestos estrogénicos, tal y como ocurría en las ratas jóvenes.

Tanto el estradiol como el raloxifeno y el tamoxifeno, disminuyeron el número de células NG2 en los animales ovariectomizados 15 días antes de la lesión penetrante, en la franja de tejido entre 0 y 350 micras desde el borde de la herida. Por el contrario, el tratamiento con bazedoxifeno u ospemifeno parece no tener un efecto claro en estas células (Figura 37A).

Empleamos el mismo tratamiento con los compuestos estrogénicos para los animales del grupo experimental OVX 16 meses. Los resultados sugieren que todos los compuestos estudiados (estradiol, raloxifeno, tamoxifeno, bazedoxifeno y ospemifeno), disminuyen el número de células inmunorreactivas para NG2 en la franja estudiada (Figura 37B).

La interacción entre los parámetros tiempo de ovariectomía y tratamiento empleado, nos permite predecir si el período de privación hormonal, influye en la respuesta del tratamiento estrogénico. En este experimento hemos comprobado que no hay tal interacción entre los diferentes grupos. Se observa, no obstante, una tendencia al aumento en el número de células NG2, en los animales OVX 16 meses, que pese a todo, no llega a ser significativo (Figura 37C).

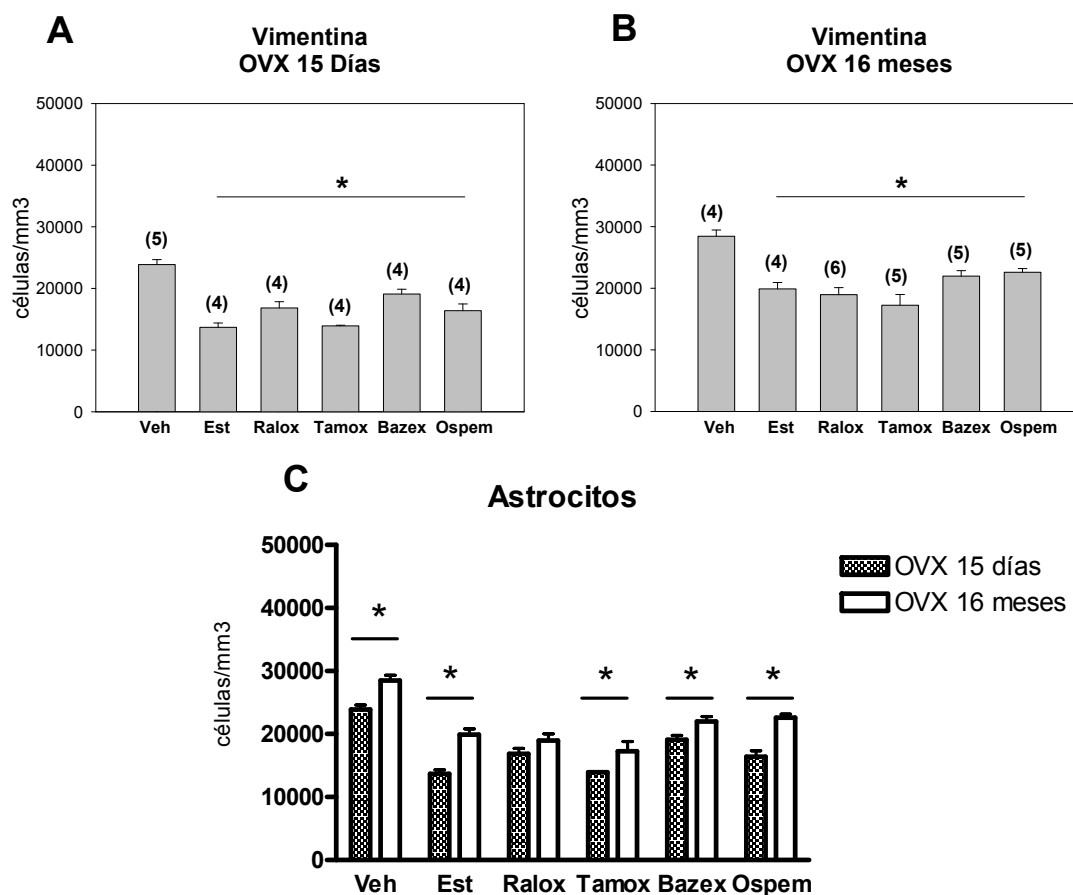


Figura 35. Número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina a una distancia de 350 μ m desde el borde lateral de la lesión en animales ovariectomizados a los 15 días previos a la lesión penetrante (OVX 15 días) (A) y a los 2 meses de edad y sometidos a una operación SHAM 15 días antes de la lesión penetrante (OVX 16 meses) (B). En ambos casos, los animales fueron tratados con vehículo (Veh), estradiol (Est), raloxifeno (Ralox), tamoxifeno (Tamox), bazedoxifeno (Bazex) u ospemifeno (Ospem) en los días 0-2 tras la lesión. Observamos una disminución significativa del número de astrocitos reactivos en todos los animales tratados y, además, observamos una interacción entre el tiempo de ovariectomía y el tratamiento, en los animales inyectados con vehículo, estradiol u ospemifeno (C). El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo en A y B y vs OVX 15 días y OVX 16 meses en C.

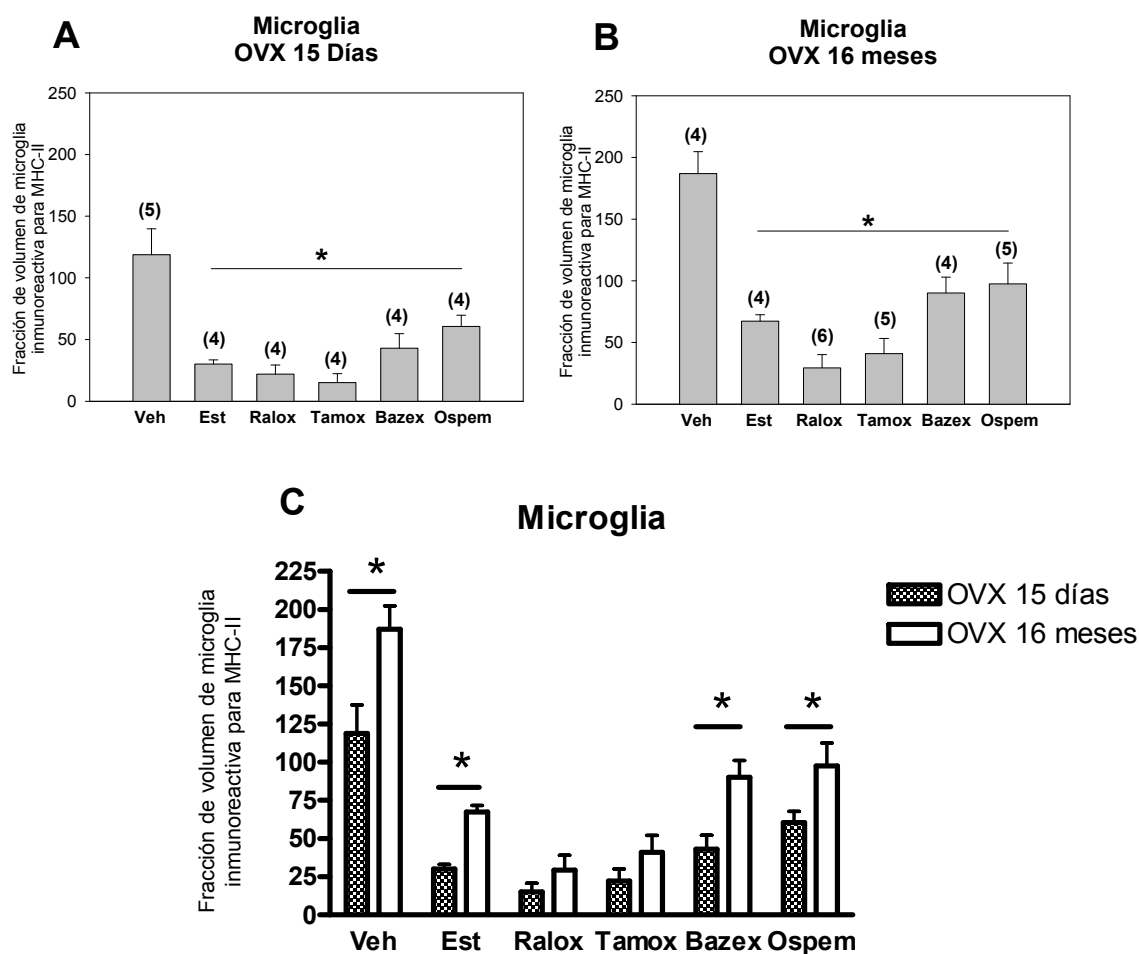


Figura 36. Fracción de volumen de la microglía inmunorreactiva para MHC-II a una distancia de 300 micras desde el borde lateral de la lesión en animales (OVX 15 días y OVX 16 meses y tratados con vehículo (Veh), estradiol (Est), raloxifeno (Ralox), tamoxifeno (Tamox), bazedoxifeno (Bazex) y ospemifeno (Ospem) en los días 0-2 tras la lesión. Observamos a una disminución significativa de la microglía reactiva en todos los animales tratados y, además, observamos una interacción entre el tiempo de ovariectomía y el tratamiento, en los animales inyectados con vehículo u ospemifeno (C). El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo en A y B y vs OVX 15 días y OVX 16 meses en C.

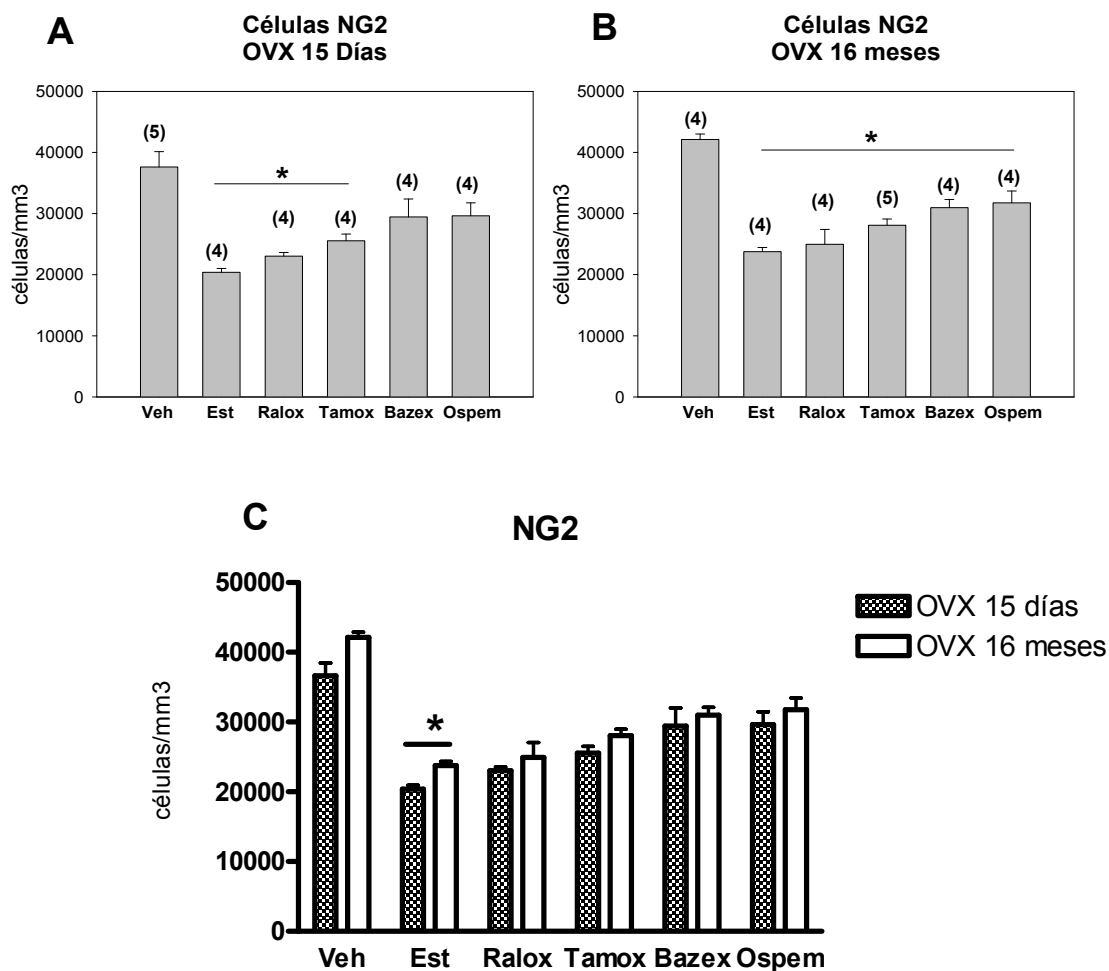


Figura 37. Número de células inmunorreactivas para NG2 a una distancia de 350 μ m desde el borde lateral de la lesión en animales ovariectomizados (OVX) a los 15 días previos a la lesión penetrante (A) o a los 2 meses de edad y sometidos a un SHAM 15 días previos a la lesión penetrante (B) y tratados con vehículo (Veh), estradiol (Est), raloxifeno (Ralox), tamoxifeno (Tamox), bazedoxifeno (Bazex) u ospemifeno (Ospem) en los días 0-2 tras lesión. Observamos una disminución significativa del número de células NG2 en los animales OVX 15 días y tratados con estradiol, raloxifeno o tamoxifeno. En los animales OVX 16 meses se produjo una disminución significativa en el número de astrocitos reactivos con todos los tratamientos estrogénicos. No se observó una interacción del tiempo de ovariectomía y del tratamiento (C). El número de animales está indicado en los paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo en A y B y vs OVX 15 días y OVX 16 meses en C.

4- Expresión de los receptores de estrógenos en las células precursoras de oligodendrocitos, tras lesión penetrante

Hemos observado que las células precursoras de oligodendrocitos, que expresan el proteoglicano NG2, proliferan intensamente tras una lesión penetrante. Además, hemos demostrado que los SERMs y el estradiol son capaces de disminuir el número de células NG2 en el borde de la herida, posiblemente a través de mecanismos, indirectos o directos, posiblemente mediados por receptores de estrógenos. En base a estos datos nos propusimos estudiar si dichas células, bajo el efecto del estradiol, expresan o potencializan la expresión de los receptores de estrógenos, tras una lesión penetrante en corteza e hipocampo. Hemos supuesto que la expresión de los receptores de estrógenos puede ser distinta en hipocampo y corteza y, además, predecimos que el estradiol puede ejercer un efecto sobre dicha expresión. Por tanto, las secciones fueron doblemente teñidas con los anticuerpos contra NG2 y contra los receptores beta ($ER\beta$) y alfa ($ER\alpha$) de estrógeno. Finalmente se estimó el porcentaje de células NG2 que colocalizaba con cada receptor de estrógenos, en CA1 del hipocampo a una distancia de hasta 400 micras desde el borde de la lesión.

Hemos observado interesantes diferencias cuantitativas y cualitativas. Las células inmunorreactivas para NG2 han sido encontradas en número elevado en el borde de la herida. Muchas de ellas expresaban el receptor alfa, pero en ningún caso detectamos la coexpresión con el receptor beta, pese a haber empleado el anticuerpo más frecuentemente utilizado contra dicho receptor beta. Sin embargo, al analizarnos el doble marcaje de las células NG2 con el $ER\alpha$ encontramos una intensa expresión de ambos los marcadores tanto en corteza como en hipocampo. El número de células que coexpresaban los marcadores NG2 y $ER\alpha$, ya alto de por sí en los animales tratados con vehículo, aumentó considerablemente en los animales tratados con estradiol y el marcaje se veía mas considerable en la corteza que en el hipocampo (Figura 39).

La localización del receptor alfa de estrógenos en los astrocitos era nuclear (Figuras 38A, B y C), y se detectó también una inmunorreactividad en las prolongaciones citoplásmicas, como se evidencia en la figura 36D y E.

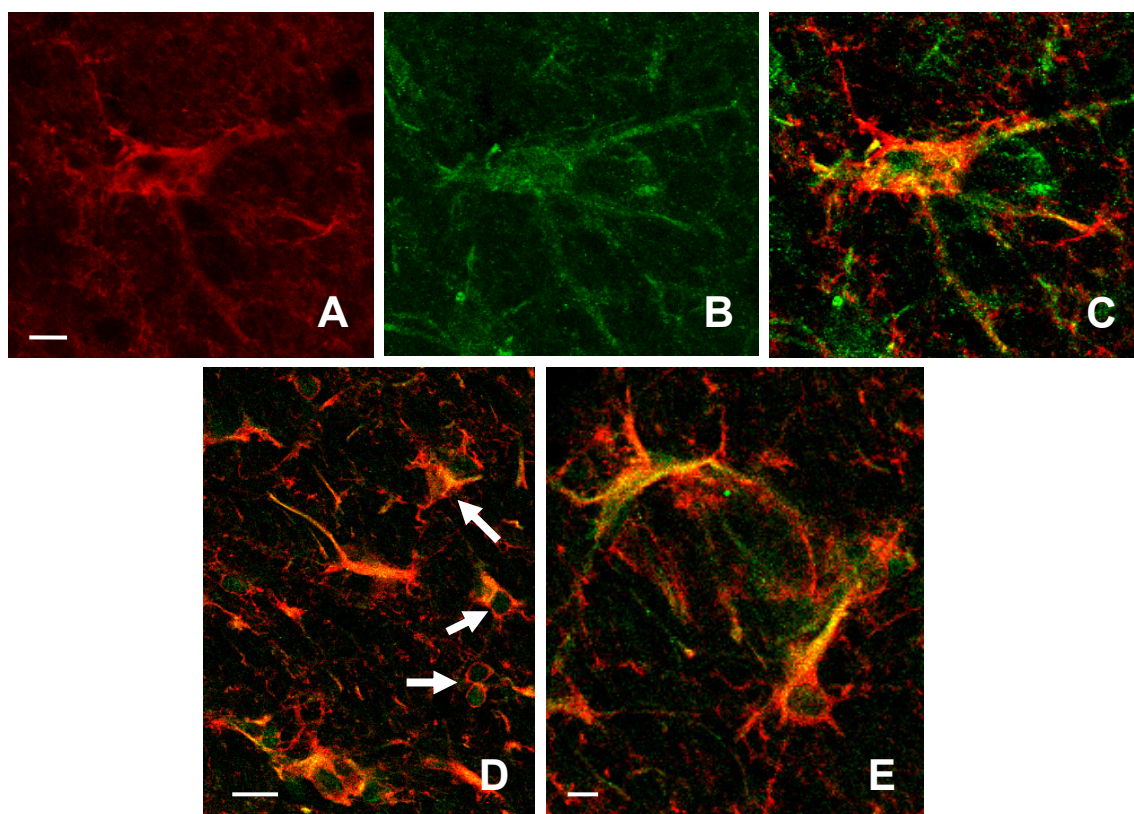


Figura 38. Inmunorreactividad frente a NG2 (rojo) y el receptor alfa de estrógeno (verde) en el hipocampo de ratas lesionadas y tratadas con vehículo. Se muestran ejemplos representativos de la expresión y localización del receptor en las células NG2. Se aprecia que la expresión de dicho receptor es nuclear y citoplásmica, como se indica por la flecha en la figura D. Escala, 10 μ m.

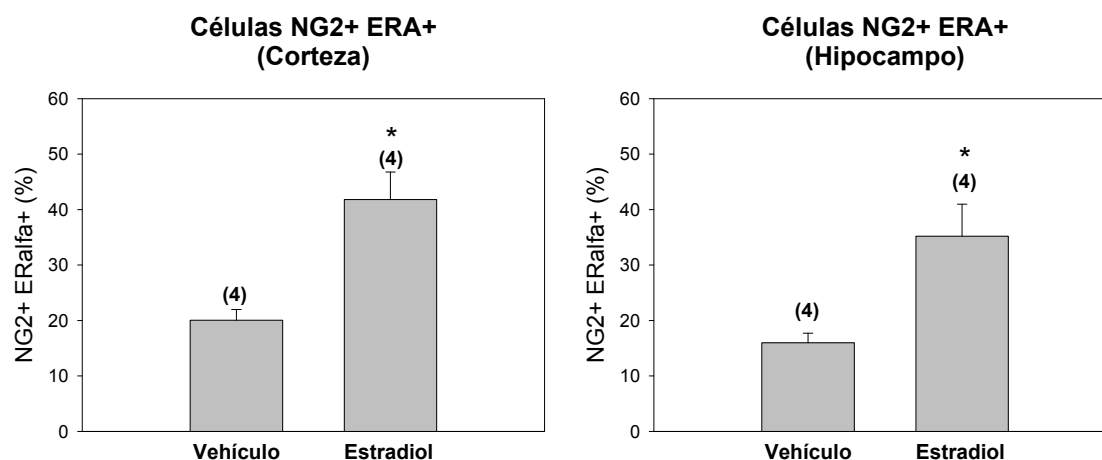


Figura 39. Porcentaje de células que colocan NG2 y el receptor de estrógeno alfa, en relación al total de células NG2. Las valoraciones se realizaron en corteza e hipocampo de ratas macho orquitectomizadas, sometidas a una lesión penetrante y tratadas con vehículo o estradiol (1mg/Kg/día), en los días 0-2 tras la lesión. El número de animales está indicado entre paréntesis. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo.

5- Expresión y proliferación de las células NG2 y astrocitos a lo largo del tiempo después de una lesión penetrante

5.1- Expresión de las células NG2 y de la astroglia a lo largo del tiempo de lesión

En ese apartado analizamos la expresión de las células NG2 y los astrocitos (vimentina o GFAP positivos) en el día 2º y en el día 8º tras la lesión. En el día 2º, observamos una disminución significativa del número de células NG2 en los animales tratados con estradiol en comparación con los animales tratados con el vehículo. Similarmente, el tratamiento con estradiol reduce significativamente la población de astrocitos inmunorreactivos para la vimentina y el GFAP en el día 2º post-lesión. Por otro lado, en el día 8º tras la lesión, observamos a una disminución del número de células NG2 inclusive en los animales tratados con vehículo (comparado con el día 2 tras la lesión) y tras administración de estradiol, el número de células inmunorreactivas

para NG2 se veía aún más reducido, pero sin una significancia estadística. Observamos, por otro lado, que el tratamiento con estradiol conlleva a una disminución significativa del número de astrocitos inmunorreactivos para la vimentina o GFAP en el día 8° (Figura 40 y 41).

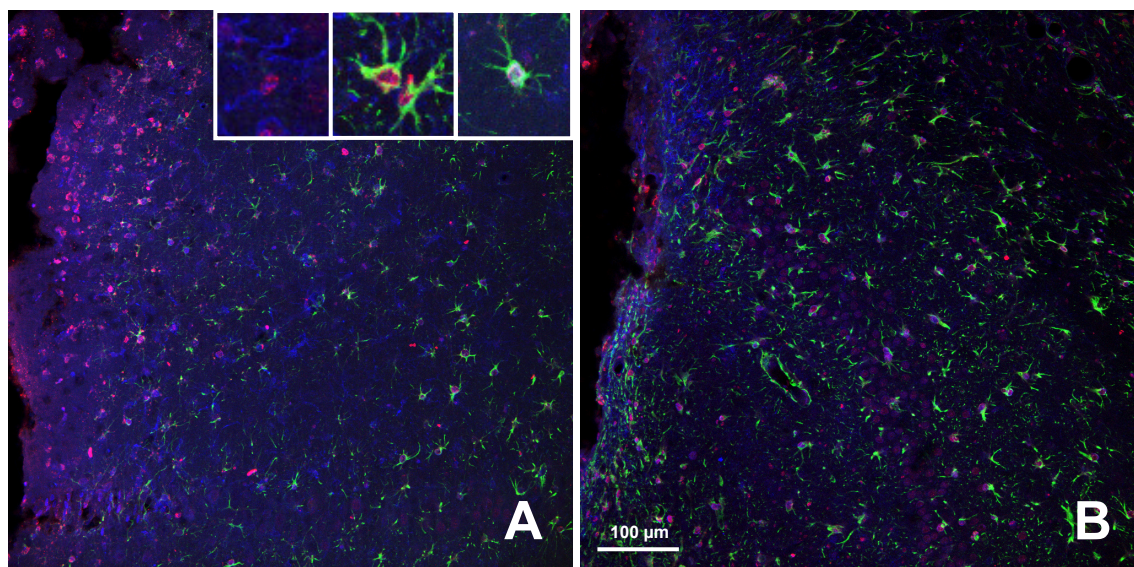


Figura 40. Inmunorreactividad frente a NG2 (azul), BrdU (rojo) y vimentina (verde) después de 2 días (A) y 8 días (B) tras la lesión penetrante en ratas macho orquidectomizadas y tratadas con estradiol. A simple vista observamos un intenso marcaje del fenotipo oligodendrocitario y un marcaje débil del fenotipo astrocitario en el día 2. Sin embargo, a cabo de ocho días después del daño, se observaba una disminución en el número de células NG2 y un aumento considerable de astrocitos vimentina positivos. Escala, 100 μ m.

5.2- Proliferación de las células NG2 y de la astrogliá

Aparte de la expresión de los marcadores gliales en el periodo post-lesión, es importante tener en cuenta si la expresión de las células NG2 y la de astrocitos está acompañada por un aumento de su proliferación. Para ello, las secciones fueron teñidas para BrdU y NG2 o vimentina o GFAP y analizadas a partir de imágenes tomadas en un microscopio confocal.

En el día 2 tras la lesión el marcaje con BrdU fue más abundante en las células NG2 que en las células vimentina o GFAP inmunorreactivas. El marcaje de las células

NG2, sin embargo, se veía disminuido y el de los astrocitos aumentado el día 8 después del daño cerebral (Figura 42). La administración temprana de estradiol disminuyó el número de células inmunorreactivas para BrdU y NG2 o vimentina o GFAP en comparación con el tratamiento con vehículo (Figura 43).

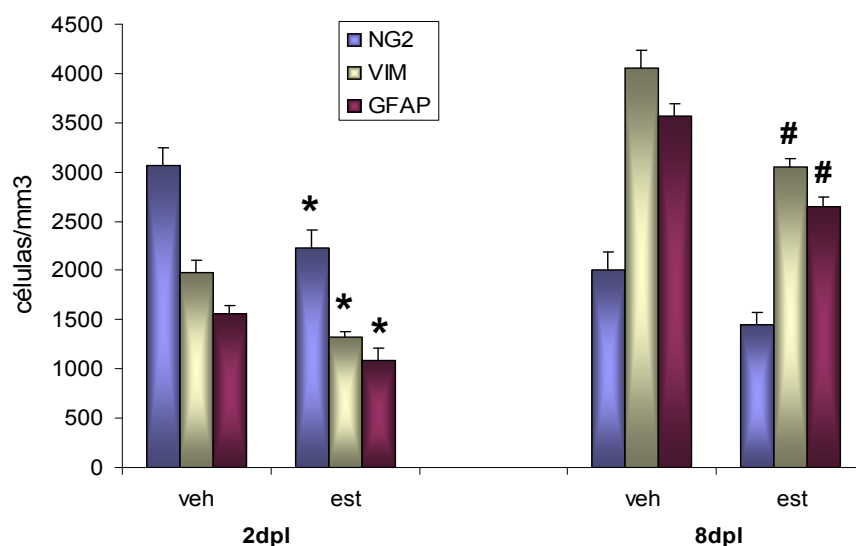


Figura 41. Número de células inmunorreactivas para NG2, vimentina (Vim) y GFAP en animales macho lesionados, tratados con vehículo (veh) o estradiol (est) en los días 0, 1 y 2 tras la lesión y sacrificados en el día 2° (2dpi) u 8° post-lesión (8dpi). Se observa una disminución en el número de células NG2 entre el día 2 y el día 8 tras la lesión mientras que el número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina y GFAP aumentan entre esos días. El tratamiento con estradiol produjo una disminución significativa en el número de astrocitos inmunorreactivos para la vimentina o GFAP en el día 8. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) vs vehículo en el día 2 y en el día 8 (#).

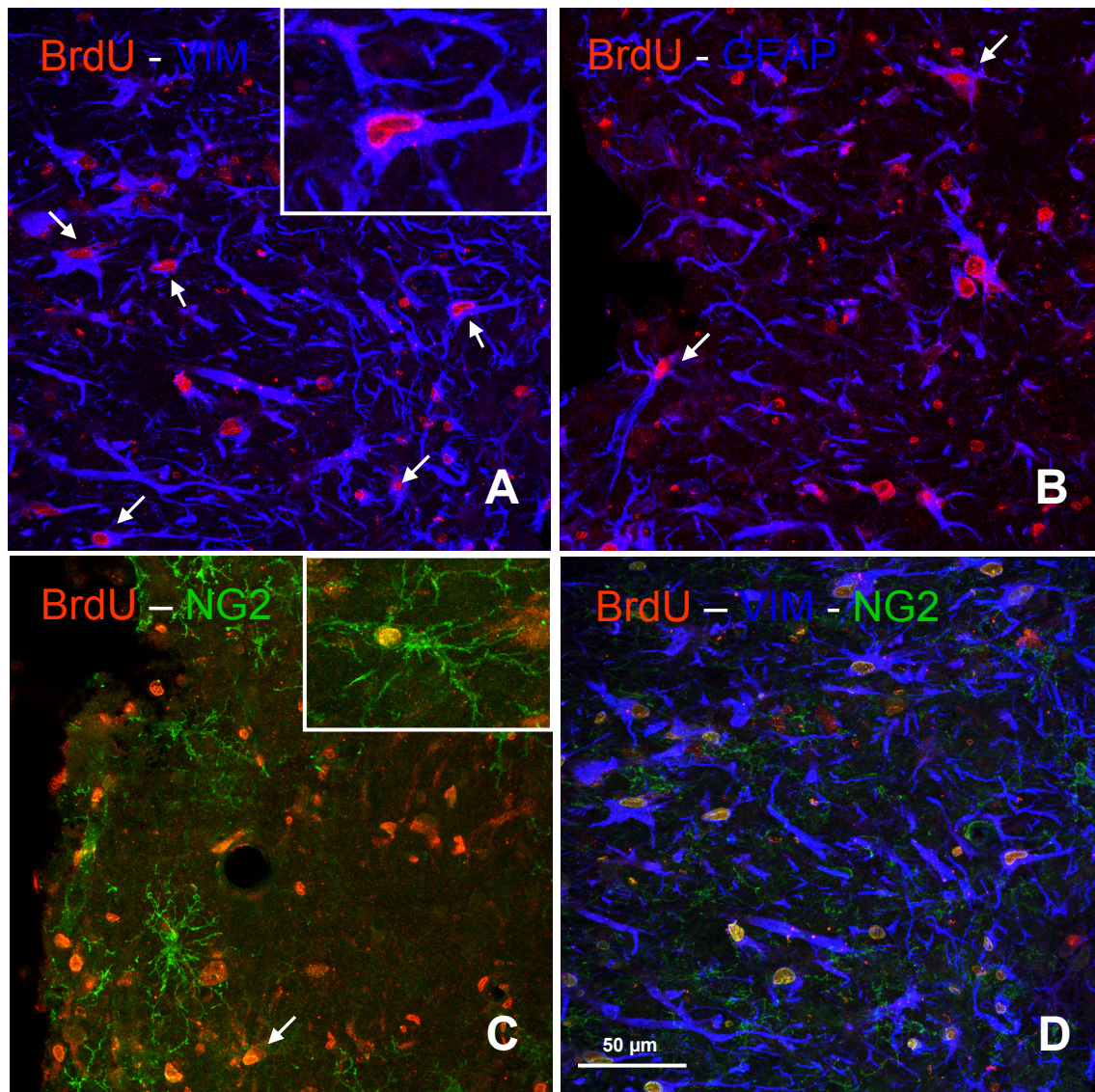


Figura 42. Colocalizaciones en el microscopio confocal para (A) BrdU y vimentina, (B) BrdU y GFAP, (C) BrdU y NG2 y (D) BrdU, vimentina y NG2 (D) en ratas orquidectomizadas, tratadas con estradiol y sacrificadas en el día 8 tras la lesión. Se observa una intensa proliferación de astrocitos vimentina positivos hasta una distancia de 150 μm desde el borde lateral de la lesión. Además, algunos astrocitos expresaban también el marcador de astrocitos maduros, GFAP. Paralelamente al aumento en la tasa de proliferación de astrocitos, se aprecia una disminución en la actividad proliferante de las células NG2. Escala, 50 μm .

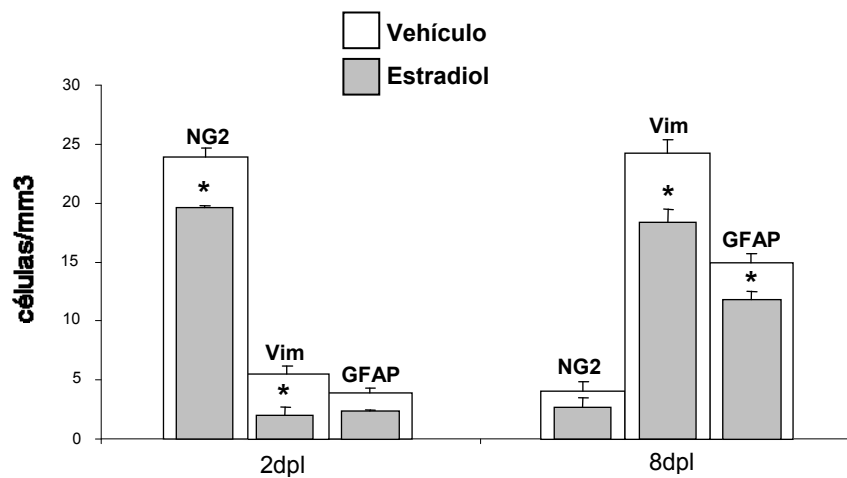


Figura 43. Número de células BrdU positivas (en mm³) distribuidas por su fenotipo glial (NG2+, vimentina+ o GFAP+) en animales macho tratados con vehículo o estradiol en los días 0, 1 y 2 y sacrificados en los días 2 y 8 tras la lesión penetrante. Vim, Vimentina. * Diferencias significativas (P<0,05) vs vehículo.

Discusión

1- La testosterona disminuye el número de astrocitos reactivos y de células de microglía reactivas, tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes: papel de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona

La protección y regeneración del tejido nervioso lesionado es uno de los campos más activos de la investigación biomédica. Los infartos cerebrales, los traumas y las enfermedades degenerativas del sistema nervioso tienen una alta incidencia en la población y provocan graves incapacidades. En nuestro estudio hemos abordado estos problemas desde un modelo de lesión penetrante, que provoca la ruptura de la barrera hematoencefálica, explorando el efecto neuroprotector de la testosterona y sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona. El tejido cerebral dañado presenta varias fases de reacción, la primera de ellas aguda, en la cual se produce una activación de la microglía, acompañada de la secreción de citoquinas. La proteína de membrana MHC-II sirve como un marcador de células de microglía reactivas (Streit et al., 1999). La densidad de células inmunorreactivas para MHC-II es muy escasa en el hipocampo de animales no lesionados, mientras que se observa una elevada densidad en la zona cercana a la herida en animales lesionados. La expresión de este marcador se debe a la activación microglial, que también se refleja en la retracción de las prolongaciones celulares y el aumento del tamaño del cuerpo celular, además de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Ladeby et al., 2005). La microglía reactiva sobre-expresa MHC-II en respuesta a neurotoxinas (Cevolani y cols., 2001), daño neural (Popovich y cols., 1997; Hong y cols., 2006) o estímulos inflamatorios (Ng y Ling, 1997; Hauss-Wegrzyniak y cols., 1998). Durante la respuesta inmunitaria, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCs) intervienen en la presentación de los antígenos a las células T. El tipo I (MHC-I), se expresa en niveles bajos en multitud de células y su función es presentar antígenos propios a las células CD8+. El complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), por el contrario, es característico de los presentadores de antígenos profesionales y se expresa en las células CD4+. En el sistema nervioso *in vivo* es la microglía casi exclusivamente la que lo expresa (Dong y Benveniste, 2001). A pesar del papel inmunitario clásico, de todas la población de células de microglía/macrófagos con expresión de MHC-I, solo algunas median la activación de la respuesta inmunitaria de las células T (Stoll y Jander, 1999). La microglía con expresión de MHC-II puede también mediar otras respuestas, como la muerte de células T infiltradas en el parénquima nervioso (Ford y cols., 1995, 1996), o la remielinización, tras su activación por TNF α (Arnett y cols., 2003). El complejo MHC-II también puede estimular cascadas

intracelulares y secreción de quimioquinas (RANTES, MCP-1, IL-8) o interleuquinas (IL-1 β , TNF- α) por las células del linaje monocítico (Altomonte y cols., 1999).

Tras la fase aguda de reacción después de una lesión cerebral se produce una fase subaguda en la que se activa la astrogliá y se secretan factores tróficos (Taupin y cols., 1993; Fagan y Gage, 1994; Woodroffe, 1995; Rothwell y Strijbos, 1995; Amat y cols., 1996; Moore y Thanos, 1996; Ghirnikar y cols., 1996; Jensen y cols., 1997; Knerlich y cols., 1999; Herx y cols., 2000). Su activación es máxima a los 7 días de la generación de la herida (García-Ovejero y cols., 2004), y da lugar a la formación de la cicatriz glial. Dicha reactividad disminuye a partir del día 14, y prácticamente ha desaparecido el día 28 tras la operación quirúrgica. Un marcador descrito para astrocitos reactivos es la vimentina (Eddleston y Mucke, 1993; Janeczko, 1993; Ridet y cols., 1997), la proteína empleada en nuestro estudio. En condiciones normales, la proporción de astrocitos inmunorreactivos para vimentina en el hipocampo de animales adultos, es muy baja (Ciriza y cols., 2004). Sin embargo, en animales lesionados se observa una elevada densidad de astrocitos inmunorreactivos formando una cicatriz glial en la proximidad de la lesión.

La gliosis es un fenómeno complejo que incluye una mezcla de respuestas positivas y negativas frente a la supervivencia y regeneración neuronales. La astrogliá mantiene la integridad de la barrera hematoencefálica y la supervivencia del tejido perilesional, pero puede impedir la regeneración axonal (Bush y cols., 1999; Cui y cols., 2001; Faulkner y cols., 2004; Silver y Miller, 2004; Myer y cols., 2006). La microgliá reactiva realiza importantes funciones positivas remodelando el tejido dañado, pero secreta citoquinas proinflamatorias y puede exacerbar el daño neuronal (Lindsay et al., 1986; Thomas, 1992; Ridet y cols., 1997; Streit y cols., 1999; Kim y de Vellis, 2005; Pekny y Nilsson, 2005). La identificación de factores que regulan la gliosis reactiva, como pueden ser las moléculas testadas en este estudio, tiene interés práctico en el desarrollo de estrategias terapéuticas que reduzcan el daño neural y promuevan la regeneración tras un daño traumático del sistema nervioso central, así como para disminuir la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas.

La activación de las células gliales es modulada por factores locales y por sustancias transportadas por la circulación sistémica, tales como las hormonas secretadas por las gónadas y las glándulas adrenales (García-Segura y Melcangi, 2006). En estudios anteriores se ha demostrado que la administración sistémica de testosterona, en los días 0, 1 y 2 tras una lesión penetrante en la corteza y el

hipocampo de ratas macho orquidectomizadas, disminuye sensiblemente el número de astrocitos inmunorreactivos para GFAP en el borde de la lesión (Garcia-Estrada y cols., 1993). Nuestros resultados extienden estos hallazgos anteriores a la microglía reactiva y además indican que la testosterona, incluso cuando se administra varios días después de una lesión del cerebro, regula tanto la astrogliosis, como la microglía reactivas.

El tratamiento temprano (días 0-2 tras una lesión penetrante en el cerebro) con testosterona en ratas macho orquidectomizadas, redujo el número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina en el borde de la herida en el hipocampo, confirmando la observación de que la administración temprana de la testosterona reduce la astrogliosis reactiva después de una lesión cerebral penetrante en ratas macho (Garcia-Estrada y cols., 1993, 1999). Además, uno de nuestros objetivos en el presente estudio era determinar si la testosterona también podía afectar la activación microglial. Para ello, analizamos la fracción de volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II en el borde de la lesión en el hipocampo. Como se ha indicado el MHC-II es un marcador de la microglía reactiva y, como cabía esperar, en nuestro estudio detectamos una alta densidad de células inmunorreactivas para MHC-II en el borde de la herida en el hipocampo de todos los animales lesionados. La administración temprana de testosterona produjo una disminución de la fracción de volumen de células inmunorreactivas para MHC-II. Por lo tanto, podemos concluir que la administración temprana de testosterona reduce tanto la activación de la astrogliosis como la de la microglía, después de una lesión penetrante en hipocampo.

La administración temprana de testosterona puede disminuir la gliosis reactiva al afectar las etapas iniciales del proceso de activación astrogliosis y microglial, que está asociado a la inducción de la expresión de vimentina en astrocitos y de MHC-II en microglía (Eddleston y Mucke, 1993; Ridet y cols., 1997; Streit y cols., 1999). Sin embargo, el tratamiento tardío con testosterona, varios días después de lesión, puede representar un paradigma más relevante de administración, enfocado a una posible intervención terapéutica, para el control de la cicatriz glial. Por lo tanto, otro objetivo del presente estudio era determinar si la administración tardía de testosterona, durante el período en el que las células gliales ya están reactivas, podría también afectar a la gliosis. Nuestros resultados indican que la administración tardía de testosterona, en los días 5-7 después de la lesión, cuando los astrocitos y la microglía ya se encuentran activados, puede también reducir la astrogliosis reactiva y la microglía reactiva. El hallazgo de que la administración de testosterona varios días después de la lesión

cerebral aún es capaz de reducir la gliosis, puede representar una potencial terapia para controlar la gliosis.

La testosterona podría ejercer sus efectos en la gliosis reactiva, actuando directamente sobre los receptores de andrógenos, o bien tras su conversión en dihidrotestosterona. Además podría actuar a través de los receptores de estrógeno, después de su conversión en estradiol. En estudios anteriores, se ha demostrado que después de una lesión penetrante u otras formas de lesión del cerebro, se induce en los astrocitos reactivos de la expresión de la aromatasa, la enzima que convierte a la testosterona en estradiol (Garcia-Segura y cols., 1999; Peterson y cols., 2001, 2004; Carswell y cols., 2005; Saldanha y cols., 2005). Además, la lesión cerebral induce la expresión de receptores estrogénicos en la astrogliá reactiva (Garcia-Ovejero y cols., 2002). Por lo tanto, la testosterona puede convertirse en estradiol por los astrocitos reactivos que expresan la aromatasa y, posteriormente, el estradiol puede actuar por un mecanismo paracrino o autocrino en los astrocitos reactivos que expresan el receptor de estrógenos. En el presente estudio hemos observado que la administración temprana y tardía de estradiol después de la lesión cerebral reduce la astrogliosis reactiva en el borde de la herida. Por lo tanto, se puede proponer que, al menos parte de los efectos tempranos y tardíos de la testosterona en la astrogliosis reactiva, pueden ser mediados por su conversión local en estradiol.

La conversión local en estradiol puede también mediar los efectos de la testosterona en la microglía. En estudios anteriores se ha demostrado que el estradiol puede reducir la activación de la microglía *in vitro* y en ratas hembras *in vivo* (Bruce-Keller y cols., 2000; Vegeto y cols., 2001, 2003, 2006) y nuestros resultados demuestran que la administración temprana o tardía del estradiol, puede también reducir la activación de la microglía en las ratas macho. En recientes estudios se ha demostrado la expresión de los receptores alfa de estrógeno en la microglía en el cerebro de ratas *in vivo* (Tapia-Gonzalez y cols., 2008) y también se ha observado la expresión del receptor de estrógeno beta en el hipocampo de monos adultos después de un período isquémico (Takahashi y cols., 2004). Alternativamente, el efecto del estradiol sobre la microglía puede ser mediado por mecanismos independientes de los receptores de estrógenos, en estas mismas células o bien a través de los receptores de estrógenos en astrogliá, células endoteliales o neuronas.

La testosterona puede también convertirse en el cerebro en su metabolito reducido, la dihidrotestosterona, por acción de la enzima 5-alfa-reductasa, que también

se expresa en células gliales (Melcangi y cols., 1999; Negri-Cesi y cols., 2004). La dihidrotestosterona es un potente agonista de los receptores andrógenicos y muchos de los efectos biológicos de la testosterona son mediados por este metabolito. Sin embargo, ya que la dihidrotestosterona no afectó al número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina, podemos concluir que el efecto de la testosterona en la astrogliosis reactiva no es mediado por su conversión a dihidrotestosterona y la subsecuente activación de los receptores androgénicos. La expresión temprana del receptor de andrógenos ha sido observada en la microglía reactiva tras una lesión penetrante en el cerebro (Garcia-Ovejero y cols., 2002). Nuestros resultados indican que la administración temprana de dihidrotestosterona reduce la fracción de volumen de la microglía inmunorreactiva para MHC-II en el borde de la herida en el hipocampo, sugiriendo que parte del efecto temprano de la testosterona en la microglía reactiva es mediado por su conversión, por la enzima 5-alfa-reductasa, en dihidrotestosterona y la consiguiente acción sobre el receptor de andrógenos.

2- La testosterona disminuye la proliferación de astroglia y microglía tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes: papel de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona

En estudios previos se ha demostrado que una lesión penetrante, no solo induce un fenotipo reactivo en la astroglia y la microglía, sino que también causa un aumento en la proliferación de astrocitos y microglía, en las cercanías de la herida (Cavanaugh, 1979; Lindsay, 1986; Takamiya y cols., 1988). En base a estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto del tratamiento temprano con testosterona en la proliferación glial, tras una lesión penetrante en el hipocampo. Tanto la testosterona, como su metabolito el estradiol fueron capaces de disminuir la proliferación astrogliar. Esto sugiere que la disminución en el número de astrocitos reactivos causada por estos esteroides puede ser debida, al menos en parte, a una reducción de su proliferación. El efecto de la testosterona podría ser debido a su transformación en estradiol. Por el contrario, no hemos observado que la dihidrotestosterona incida en la proliferación de la astroglia. Por lo tanto, parece ser que la dihidrotestosterona reduce el número de células de astroglia reactiva por un mecanismo que no implica una reducción en su proliferación y que la dihidrotestosterona no está involucrada en la regulación de la astroglia reactiva ejercida por la testosterona.

La testosterona y el estradiol podrían estar influyendo en la progresión del ciclo celular. Los astrocitos que se encuentran en el proceso de división, expresan proteínas del ciclo celular, como por ejemplo la ciclina D1 y la quinasa cdk4 (Kato y cols., 2003) y por tanto son sensibles a cambios en la progresión del ciclo. Cuando hay una lesión cerebral, se produce un aumento de la proliferación celular (Chirumamilla y cols., 2002) y los astrocitos reactivos expresan, tanto marcadores de proliferación (PCNA), como proteínas del ciclo celular (Zhu y cols., 2007). Un reciente estudio llevado a cabo por Zhu y cols., (2007) demuestra que la administración de olomoucina, un inhibidor de ciclinas y, por tanto, del ciclo celular, en un modelo de hipoxia, revierte el aumento de la proliferación glial. Otras moléculas que bloquean el ciclo celular, como el flavopiridol y la roscovitina son también capaces de rebajar el daño cerebral, previniendo la proliferación de astroglia y microglia, atenuando la activación microglial y reduciendo la muerte neuronal inducida por el etopósido, en cultivos primarios (Cernak y cols., 2005). Un efecto similar podría ser ejercido por la testosterona y el estradiol. De hecho se ha observado que las dosis altas de estradiol tienen un efecto inhibitorio y proapoptótico del ciclo celular en células cancerosas adrenales *in vitro*. Asimismo, estos efectos están asociados a una disminución de la expresión de las ciclinas D1 y B1 que bloquean la transición G2/M del ciclo celular (Brown y cols., 2008). El estradiol, sin embargo, en dosis fisiológicas estimula la proliferación de los cánceres más comunes, al activar a la ciclina D1 (Eeckhoutte y cols., 2006; Wang y cols., 2007).

A diferencia de lo observado en el caso de la proliferación de los astrocitos, de los tres esteroides ensayados, la testosterona, el estradiol y la dihidrotestosterona, solamente la testosterona fue capaz de reducir significativamente la proliferación de la microglia. Esto sugiere que la testosterona debe ejercer su efecto sobre la proliferación microglial por un mecanismo independiente de su metabolización a estradiol y dihidrotestosterona. La ausencia de efecto de la dihidrotestosterona, un potente agonista de los receptores de andrógenos, sugiere que el efecto de la testosterona también debe de ser independiente de la activación de los receptores nucleares de andrógenos. Los mecanismos podrían implicar la acción de la testosterona sobre posibles receptores de membrana con menor afinidad para la dihidrotestosterona (Ramirez y cols 1996; Papakonstanti y cols., 2003).

3- La testosterona regula el número y la proliferación de células NG2 tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes: papel de sus metabolitos estradiol y dihidrotestosterona

Un tema muy novedoso e interesante es el estudio del papel de los andrógenos y estrógenos sobre las células NG2. El empleo de diferentes marcadores inmunocitoquímicos (Figura 44), permite la identificación de los oligodendrocitos y sus células precursoras. Los anticuerpos PDGF- α^+ , A2B5, O4 y O1 identifican, respectivamente, al progenitor temprano de los oligodendrocitos (Levine y cols., 2001), al progenitor tardío y a los oligodendrocitos postmitóticos inmaduros. Los marcadores de superficie celular son muy ventajosos en estudios con cultivos celulares, pero algunos son sensibles a detergentes, marcan inespecíficamente a la mielina y requieren de técnicas especiales para su empleo en el tejido intacto. Entre ellos tenemos a los galactocerebrósidos (O1), ganglósidos (LB1, R24) y los sulfátidos (O4). La utilización de anticuerpos contra la proteína básica de la mielina (MBP), que representa el 30% del contenido proteico de la mielina en el SNC, permite el marcaje celular de las vainas de mielina de los oligodendrocitos maduros. La 2'3'-nucléotido cíclico 2'-fosfodiesterasa (CNPasa), ha sido descrito como marcador intracelular de los somas de oligodendrocitos maduros mielinizantes (Ness y cols., 2005). Otros marcadores de oligodendrocitos son el Rip, las anfoterias P-30 y HMG-1, la enzima anhidrasa carbónica II y la transferrina (Ramirez-Expósito y Martinez-Martos, 1998). Por otro lado, la identificación de progenitores de oligodendrocitos jóvenes y adultos también se puede llevar a cabo con el empleo del anticuerpo NG2, que marca el proteoglicano condroitina sulfato NG2 (Chatterjee y cols., 2008; Hampton y col., 2007; Baracskey y cols., 2007; Wu y cols., 2005; Hubbard y cols., 2002; Kirvell y cols., 2002). En nuestro estudio hemos empleado el marcador NG2 para la identificación de células con propiedades progenitoras y precursoras de oligodendrocitos.

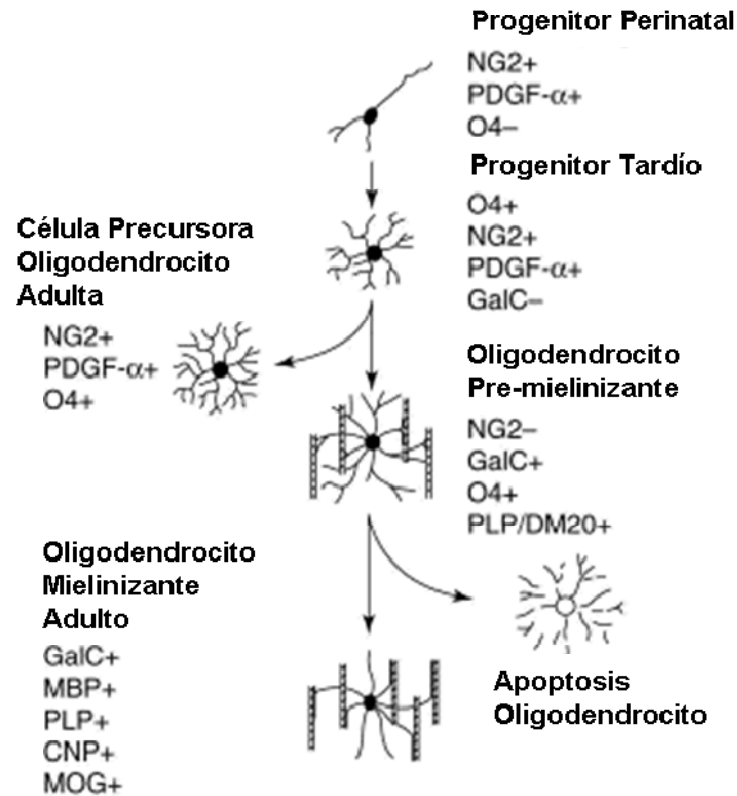


Figura 44. Diferentes marcadores moleculares nos permiten identificar los diferentes periodos de la diferenciación y maduración de los oligodendrocitos. Desde el desarrollo embrionario hasta el sistema nervioso adulto, los oligodendrocitos expresan diferentes proteínas, proteoglicanos, factores de crecimiento y sus respectivos receptores. El proteoglicano NG2 se expresa en los progenitores de oligodendrocitos y en las células precursoras de oligodendrocitos adultos. Además, tras una lesión, el proteoglicano NG2 se encuentra sobreexpresado. Abreviaturas: CNP, 23-cíclico nucleótido 3-fosfohidrolasa; GalC, galactocerebrósido; MBP, proteína básica de mielina; MOG, glicoproteína del oligodendrocito mielinizante; PDGF, factor de crecimiento derivado de la plaqueta; PLP, proteína proteolípida. (Basado en Levine y cols., 2001).

Las células NG2 conforman una importante población glial que, dependiendo de la zona cerebral, llega a alcanzar del 3 al 10% del total celular. Estas células, juntamente con la microglía, responden inmediatamente tras una lesión cerebral, asumiendo un aspecto reactivo con prolongaciones gruesas. El inicio de la respuesta frente a una lesión es rápido y las células NG2 reactivas pueden ser detectadas a las 24 horas después del daño cerebral. Además, se produce un aumento en el número total de células inmunoreactivas para NG2 en la zona lesionada, lo que puede ser debido a la proliferación local de células precursoras o a la activación de las células progenitoras de la zona subventricular que migran hacia la herida (Zerlin y cols., 2004).

Se ha detectado este aumento de células NG2 en el cerebro de ratones sometidos a isquemia experimental (Hoehn y cols., 2005), lesión penetrante (Coksaygan y cols., 2006; Tan y cols., 2005) y tras una deaferentación de la capa molecular del giro dentado por lesión de la corteza entorrinal (Dehn y cols., 2006). El número de células NG2 comienza a declinar a los 7-10 días después del daño cerebral (Levine y cols., 2001). Esta disminución puede ser debida a muerte celular (Byrnes y cols., 2007; Pang y cols., 2007; Gerstner y cols., 2007; Rothstein y cols., 2005; Jin y cols., 2004; Baud y cols., 2004; Raghupathi, 2004), a la migración a sitios alejados de la lesión (Fok-Seang y cols., 1995; Schnaedelbach y cols., 2000; Groves y cols., 1993) y a la diferenciación de las células NG2 en otros tipos de células (Levine y cols., 2001; Moon y Fawcett, 2001; Belachew y cols., 2003; Alonso, 2005; Zai y Wrathall, 2005; Tatsumi y cols., 2005; Buffo y cols., 2005, 2008). Por ejemplo, en un estudio previo se observó que el fenotipo de las células proliferativas en el día 2 tras la lesión era en su mayoría NG2+, seguido por un bajo porcentaje de astrocitos positivos para la GFAP (Alonso, 2005). Nuestros resultados han corroborado esta observación y muestran que el porcentaje de astrocitos marcados con BrdU y que expresaban la vimentina, era superior al de los que colocan BrdU y GFAP, sugiriendo que muchos de estos astrocitos tenían un fenotipo inmaduro. También de acuerdo con Alonso (2005), observamos que tras un periodo de 3 días después de la lesión, el fenotipo cambia radicalmente, con una disminución abrupta del número de células NG2 y un aumento considerable de los astrocitos. Al cabo de 6 días, el número de células NG2 se veía aún más disminuido y el de astrocitos más aumentado. Estos resultados son compatibles con una posible diferenciación de células NG2+ en astrocitos (Alonso, 2005).

En el presente estudio, hemos observado que la testosterona y el estradiol, pero no la dihidrotestosterona, son capaces de reducir el número de células NG2 en el borde de la lesión en animales orquidectomizados. Además, la proliferación de células NG2 se ve disminuida en los animales tratados con testosterona o estradiol. Estos resultados sugieren que la testosterona puede reducir el número de células NG2 tras una lesión cerebral, disminuyendo su proliferación, por un mecanismo que puede estar en parte mediado por su conversión en estradiol. No obstante, se ha descrito que el tratamiento prolongado de los oligodendrocitos con estradiol estimula su proliferación (Jung-Testas et al., 1992; Marin-Husstege et al., 2004; Zhang et al., 2004) y les protege de la muerte celular inducida por la hipoxia o agentes tóxicos (Gerstner et al., 2007; Takao et al., 2004). Estos resultados han sido obtenidos en cultivos primarios de oligodendrocitos y en algunos modelos de lesión tóxica, lo que puede explicar las

diferencias con nuestras observaciones. Por otra parte, el estradiol aumenta la diferenciación de oligodendrocitos *in vitro* (Zhang y cols., 2004) y es posible que la reducción en el número de células NG2+ observado en nuestro estudio tras el tratamiento con testosterona o estradiol sea debido a un incremento en la diferenciación de las células NG2 a oligodendrocitos maduros. Paralelamente, nuestros datos sugieren que el estradiol no afecta a la posible conversión de células NG2 en astrocitos ya que disminuye de una manera similar el número y la proliferación de ambos tipos de células. No obstante, nuestros resultados son compatibles con la posibilidad de que el efecto del estradiol sobre el número de astrocitos reactivos sea en parte debido a una disminución en el número de progenitores NG2.

Los efectos directos del estrógeno sobre los oligodendrocitos no han sido adecuadamente estudiados, a pesar de que en uno de los primeros trabajos sobre los efectos de la hormona en el cerebro, se describió que la administración de estradiol aumenta la mielinización cerebral en ratas neonatales (Curry y Heim, 1966). También se ha descrito un aumento de la expresión de la proteína básica de mielina en oligodendrocitos en cultivo (Jung-Testas y cols., 1992), tras la administración de estradiol. Los efectos de la testosterona y su metabolito estradiol sobre las células NG2 que hemos observado en nuestro estudio podrían representar un efecto directo del estradiol sobre estas células, puesto que la expresión del receptor alfa de estrógenos se ha detectado en cultivos primarios de oligodendrocitos (Jung-Testas y cols., 1992; Santagati y cols., 1994; Zhang y cols., 2004; Takao y cols., 2004). Nuestros resultados que demuestran inmunorreactividad para el receptor de estrógenos alfa en algunas células NG2 apoyan esta posibilidad. Por el contrario, a pesar de que se ha descrito inmunorreactividad para el receptor beta de estrógenos en el citoplasma de oligodendrocitos *in vitro* (Zhang et al., 2004) y en la medula *in vivo* (Platania y cols., 2003), en nuestro estudio no hemos observado dicha expresión. Esto puede ser debido a la mayor especificidad del anticuerpo usado en nuestro estudio respecto a la de los anticuerpos disponibles anteriormente. Una observación interesante es que el tratamiento con estradiol aumenta el porcentaje de células NG2 que son inmunoreactivas para el receptor de estrógeno alfa. Esto puede ser debido a que el tratamiento con estradiol produzca una translocación del receptor de estrógeno alfa, desde las prolongaciones de las células NG2 hacia el soma y el núcleo, y su acumulación en estos compartimentos celulares, con lo que la visualización de la colocalización sería más evidente o podría representar una verdadera regulación por el estradiol de la expresión de su propio receptor.

4- Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) regulan la gliosis tras una lesión cerebral penetrante en ratas hembra adultas jóvenes: efectos del tratamiento temprano

Puesto que nuestros estudios previos mostraron un efecto del estradiol en la regulación de la gliosis reactiva, decidimos ensayar también el efecto de distintos moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs). Los SERMs actúan como agonistas de los receptores de estrógeno en algunos tejidos y como antagonistas en otros (Jordan, 2003; Riggs y Hartmann, 2003) y se utilizan en terapia humana. Pensando en una estrategia neuroprotectora, la ventaja de los SERMs sobre el estradiol es que no tienen los efectos periféricos no deseados de la hormona pero pueden mantener los efectos protectores en el cerebro. En nuestro primer experimento ensayamos dos SERMs: el tamoxifeno y el raloxifeno. En ciertos tipos de tumores que expresan los receptores de estrógeno, el tamoxifeno actúa como un antagonista competitivo de estos receptores y es usado en el tratamiento del cáncer de mama. Por otro lado, algunos estudios sugieren que el tamoxifeno tiene una acción anti-inflamatoria, tanto en el hombre, como en modelos animales (Cushman y cols., 2001; Misiewicz y cols., 1996). El raloxifeno pertenece a la familia de los benzotiofenos y se utiliza para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Presenta la ventaja de no unirse a los receptores estrogénicos del útero, careciendo, por tanto, de la acción teratogénica que a menudo a los tratamientos prolongados con estradiol.

En nuestro estudio hemos observado que el tratamiento temprano con los SERMs, es capaz de reducir significativamente el número de células de microglía reactiva (raloxifeno) y el número de astrocitos reactivos (tanto tamoxifeno como raloxifeno), tras una lesión penetrante. Se ha comprobado que ambos SERMs disminuyen la respuesta inflamatoria en células de microglía *in vitro* (Suuronen y cols., 2005) y previenen la pérdida neural excitotóxica en el hipocampo de ratas inyectadas con ácido kaínico (Ciriza y cols., 2004). Por otra parte, el raloxifeno disminuye el número de células de microglía en el cerebro de animales viejos (Lei y cols., 2003) y el tamoxifeno reduce el daño cerebral tras isquemia *in vivo* en ratas (Kimelberg y cols., 2003; Mehta y cols., 2003; Feng y cols., 2004; Zhang y cols., 2005). Además, se ha comprobado recientemente que, tanto el tamoxifeno, como el raloxifeno reducen la reactividad microglial en el cerebelo de ratas, tras la inyección sistémica de LPS (Tapia-Gonzalez y cols., 2008). *In vitro*, los SERMs pueden tener efectos neuroprotectores directos en células neuronales (Du y cols., 2004; Benvenuti y cols., 2005; Biewenga y cols., 2005). Nuestros resultados apoyan la idea de que, *in vivo*,

dichos efectos neuroprotectores, al menos en parte, se dan gracias a la regulación de la glía por parte de los SERMs.

La disminución de la gliosis reactiva gracias a la acción de los SERMs, sugiere que los mecanismos a través de los cuales el estradiol disminuye la reactividad, están mediados por los receptores de estrógeno. Se ha propuesto que sólo está implicado uno de los dos receptores descritos hasta el momento, en la reducción de la reactividad glial: Vegeto y cols., (2003) observaron que el estradiol reduce la activación microglial en ratones knock-out para el receptor beta de estrógeno, pero no en los knock-out para el receptor alfa, lo que significaría la implicación exclusiva del receptor alfa. Sin embargo, el agonista selectivo del receptor beta, DPN, pero no el agonista selectivo del receptor alfa, PPT, reducían la activación microglial, en un modelo *in vitro* (Baker y cols., 2004). En nuestro estudio, ambos agonistas disminuían la reactividad tanto astrogial, como microglial de forma significativa, tanto por separado como combinados. Este resultado sugiere que ambos receptores, alfa y beta, pueden mediar la disminución en la gliosis reactiva, como resultado de su modulación por compuestos estrogénicos. En contraste con las acciones frecuentemente opuestas de los receptores alfa y beta de estrógenos en distintos tipos celulares (Hall y McDonnell, 1999; Pettersson y cols., 2000; Liu y cols., 2002; Lindberg y cols., 2003), no hemos detectado ningún antagonismo entre las acciones del DPN y del PPT. Tampoco hemos encontrado un efecto sinérgico, ya que no encontramos diferencias significativas en el tratamiento de cada agonista por separado o de su combinación.

Además del recuento del número de células gliales, también hemos realizado un estudio sobre la proliferación astrocitaria y microglial, evaluada como el número de células gliales reactivas inmunorreactivas para BrdU. El tratamiento temprano con tamoxifeno o raloxifeno disminuyó la proliferación astrocitaria tras la lesión en el borde de la herida. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que indican que el tamoxifeno y el raloxifeno tienen un efecto terapéutico al inhibir la proliferación de células tumorales (Zhang y cols., 2000; Hui y cols., 2004; Smitherman y cols., 2000). Es posible que el tamoxifeno y el raloxifeno pudieran utilizar el mismo mecanismo en células tumorales y en las células de glía reactiva. Tanto el DPN o el PPT, como la combinación de ambos demostraron ser eficaces al reducir la proliferación astrocitaria, sugiriendo que los receptores alfa y beta de estrógeno están implicados en el efecto antiproliferativo de los compuestos estrogénicos sobre la astroglia reactiva. Por el contrario, ni el estradiol ni los SERMs ni los agonistas selectivos de los receptores de estrógeno PPT y DNN, fueron capaces de reducir la proliferación microglial tras el

daño cerebral, a pesar de que sí son capaces de disminuir el número de células de microglía reactivas en el borde de la lesión. Esto indica que los compuestos estrogénicos disminuyen la activación de la microglía reactiva pero no su proliferación.

Otro objetivo de nuestro estudio fue determinar el efecto de los compuestos estrogénicos sobre las células NG2. En nuestro estudio hemos observado que el estradiol, el raloxifeno y el tamoxifeno disminuyen el número de células NG2 y, además, regulan su proliferación en la zona lesionada. Como se ha discutido antes, una posible explicación para la reducción de la proliferación oligodendrocitaria puede ser el retardo de la salida de los oligodendrocitos del ciclo celular cuando tratamos las células con estradiol o tamoxifeno (Marin-Husstege y cols., 2004). Por otro lado, suponemos que el raloxifeno mimetiza el efecto del estradiol al retardar o inhibir la progresión del ciclo celular en nuestro modelo de lesión penetrante en ratas. La acción de los SERMs sobre el número de las células NG2 puede estar mediada por el receptor alfa de estrógeno, ya que el PPT, agonista selectivo de este receptor, produjo los mismos efectos. Esta observación está de acuerdo con la detección de inmunoreactividad para el receptor alfa de estrógeno en las células NG2. Sin embargo, los datos obtenidos con el agonista selectivo del receptor de estrógenos beta, DPN, sugieren que también el receptor beta parece participar en la disminución de la proliferación de las células NG2, por lo menos tras un tratamiento tardío. La acción de los compuestos estrogénicos sobre las células NG2 a través del receptor beta podría estar mediada por otros tipos celulares que expresan dicho receptor, como las neuronas.

5- La administración tardía de los SERMs modula la expresión y proliferación de la glía reactiva, en ratas macho jóvenes lesionadas

En el presente estudio se ensayó el efecto de los SERMs en tratamientos tardíos, en los días 5, 6 y 7 después de la lesión, una vez la glía ya está activada, en ratas macho orquidectomizadas, lo cual puede representar un paradigma relevante en la administración para posibles intervenciones terapéuticas en el control de la cicatriz glial. Hemos observado que el tratamiento tardío con tamoxifeno provoca una reacción antiinflamatoria, reduciendo el número de células de microglía, astroglia reactiva y NG2 reactivas. El tamoxifeno y los agonistas selectivos de los receptores de estrógeno PPT y DPN también fueron capaces de disminuir la proliferación de las células NG2 en tratamientos tardíos. Aunque en principio estos resultados no sean comparables directamente con los obtenidos con un tratamiento temprano en ratas hembra en el

estudio anterior, si que indican que los compuestos estrogénicos podrían tener una utilidad terapéutica para el tratamiento de la gliosis reactiva en ambos sexos e incluso administrados varios días después del inicio de la lesión cerebral.

6- Los SERMs administrados tempranamente disminuyen la glía reactiva en el cerebro lesionado de ratas viejas

Los efectos tróficos y protectores del estradiol en el cerebro, han sido analizados en numerosos estudios. Inicialmente, se pensaba que los efectos tróficos del estradiol ocurrían exclusivamente durante el desarrollo y el período neonatal temprano. Así, Toran-Allerand (1991) encontró que el estradiol aumenta el crecimiento neurítico y la arborización de las ramas neuríticas en cultivos organotípicos del cerebro de ratones. Posteriormente se observó que el estradiol también ejercía estas acciones durante la edad adulta (McEwen y cols., 2000; Wise y col., 2000). El estradiol promueve la formación de espinas dendríticas de las células piramidales de CA1 en ratas ovariectomizadas (Gould y cols., 1990; Woolley y cols., 1997) y estimula la sinaptogenesis (Woolley y cols., 1996). Los estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que la terapia con estradiol en el período perimenopáusico mejora la memoria verbal, disminuyen el riesgo de la enfermedad de Alzheimer y reduciendo el riesgo o la severidad de enfermedades neurodegenerativas asociadas a accidentes cerebrovasculares (Wise y cols., 2000; Henderson y cols., 1997; Paganini-Hill y cols., 1995; Sherwin, 1996, 1997). Los estudios experimentales en animales han demostrado claramente que el estradiol ejerce acciones neuroprotectoras en el cerebro adulto (García-Segura y cols., 2001). Por ejemplo, el tratamiento de ratas ovariectomizadas con estradiol disminuye significativamente los daños causados tras una lesión hipóxico-isquémica (Simpkins y cols., 1997; Alkayed y cols., 1998; Dubal y cols., 1998; Zhang y cols., 1998) y lesiones causadas por otros estímulos neurotóxicos (Azcoitia y cols., 1998, 1999). Por otra parte, la ausencia prolongada de hormonas ováricas durante la vida adulta puede estar implicada en eventos neurodegenerativos (Dubal y cols., 2001) y además el tiempo de las respuestas genéticas (transcripción del gen mediante la unión del ligando con el receptor estrogénico) y celulares al insulto cerebral está desregulado en animales viejos comparados con ratas jóvenes o de mediana edad (Badan y cols., 2003; Popa-Wagner y cols., 2007b).

El presente estudio se basa en la realización de lesiones penetrantes en ratas viejas (18 meses), ovariectomizadas a diferentes edades, con el objetivo de evaluar si

el tiempo de privación hormonal puede influir en los efectos antiinflamatorios del estradiol. En nuestros experimentos utilizamos dos grupos de animales: el primer grupo de ratas fue ovariectomizado a los 2 meses de edad y cuando cumplieron los 18 meses, les hicimos una pseudo-cirugía y 15 días después fueron lesionados; el segundo grupo fue ovariectomizado a los 15 días previos a la lesión. Por lo tanto, tenemos dos variables distintas en este estudio: el tiempo de privación hormonal y el tratamiento. La ovariectomía por sí sola ya es capaz de activar a la glía (Flores y cols., 1999). Se ha descrito que en ratones ovariectomizados, sin reemplazo hormonal con estradiol, se produce un aumento en el número de astrocitos positivos para GFAP, en 49 días (McAsey y cols., 2006). Por otro lado, el envejecimiento en ratones se ha asociado a un aumento de la gliosis y de la expresión de GFAP (Anderson et al., 2002, Piedra et al., 2000 y Kohama et al., 1995). En un estudio anterior se ha demostrado que el estradiol, a dosis farmacológicas, y el raloxifeno disminuyen la gliosis asociada al envejecimiento en ratones entre 20 y 24 meses de edad (Lei y cols., 2003). Este estudio apoya la hipótesis de que el estradiol puede reducir la activación de la astrogliá y microgliá asociada al envejecimiento. Por lo tanto, es posible que el aumento relativo de la gliosis reactiva asociada con la edad, esté relacionado con una disminución de los niveles de las hormonas gonadales (Coquelin y Desjardins, 1982, Flurkey y cols., 1982, Nelson y cols., 1992; Parkening y cols., 1982).

En nuestro estudio hemos observado que las ratas ovariectomizadas a los 2 meses de edad (16 meses de privación hormonal), presentaban un aumento significativo en el número de células de microgliá reactiva y de astrogliá reactiva, en comparación con las ratas ovariectomizadas a los 18 meses de edad (15 días de privación hormonal). Por lo tanto, el tiempo de privación hormonal en nuestro experimento podría estar directamente implicado en la activación glial. Por otra parte, hemos observado que el estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyen la gliosis reactiva, tanto en animales con 15 días de privación hormonal, como en animales con 16 meses de privación hormonal. El tratamiento con tamoxifeno ejerce un efecto aún más prominente que el raloxifeno, tanto en las ratas ovariectomizadas a los 2 como a los 18 meses de edad. Además, hemos analizado el efecto de otros dos SERMs cuyas acciones sobre el tejido nervioso son poco conocidas: el bazedoxifeno y el ospemifeno. Los estudios previos sobre estos SERMs se han centrado fundamentalmente en sus efectos sobre los sistemas óseo y reproductor (Albertazzi y cols., 2005; Uebelhart y cols., 2008; Kallio y cols., 2008; Gennari y cols., 2007; Michael y cols., 2007; Komi y cols., 2006; Qu y cols., 2000). Por lo tanto, éste es el primer estudio que caracteriza la acción de dichos compuestos sobre la glía reactiva.

Nuestros resultados demuestran que el bazedoxifeno y el ospemifeno ejercen un efecto significativo sobre la astroglia y microglia reactivas de ratas ovariectomizadas, tanto a los 2 meses como a los 18 meses de edad. Por otro lado, no observamos un efecto significativo del bazedoxifeno y el ospemifeno en el número de células NG2 de ratas ovariectomizadas a los 2 meses de edad. Sin embargo, observamos una disminución del número de células NG2 en las ratas ovariectomizadas a los 18 meses de edad y tratadas con bazedoxifeno y ospemifeno en comparación a las ratas tratadas con vehículo. Por lo tanto estos dos compuestos parecen ejercer un efecto sobre la gliosis reactiva cuando el tiempo previo de privación hormonal es bastante largo. No obstante nuestros resultados indican que el estradiol el tamoxifeno y el raloxifeno producen en general efectos similares sobre la glía reactiva en ratas viejas y jóvenes, independientemente del tiempo previo de privación hormonal, y pueden ser considerarlos de gran interés potencial para regular el proceso inflamatorio asociado al envejecimiento y a las lesiones cerebrales traumáticas o neurodegenerativas.

Conclusiones

1- La administración temprana y tardía de testosterona disminuye el número de astrocitos reactivos, de células de microglía reactiva y de células NG2 tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes.

2- La administración temprana y tardía de estradiol después de la lesión cerebral reduce el número de astrocitos reactivos, de células de microglía reactiva y de células NG2 alrededor de la herida. Esto sugiere que por lo menos parte de los efectos tempranos y tardíos de la testosterona en la gliosis pueden ser mediados por su conversión local en estradiol.

3- Ni la administración temprana ni la administración tardía de dihidrotestosterona tienen un efecto significativo sobre el número de astrocitos reactivos. Tampoco afectan al número de células NG2. Esto sugiere que la dihidrotestosterona no media los efectos de la testosterona sobre estas células.

4- La dihidrotestosterona en un tratamiento temprano, pero no en un tratamiento tardío, reduce el número de células de microglía. Esto sugiere que la dihidrotestosterona puede mediar en parte el efecto de la testosterona sobre la microglía en un tratamiento temprano.

5- La administración de testosterona y estradiol disminuyen la proliferación de los astrocitos reactivos, de las células de microglía reactiva y de las células NG2 tras una lesión penetrante. Esto sugiere que la reducción en el número de células de glia reactiva causada por estos esteroides puede ser en parte debida a una reducción en su proliferación.

6- La administración temprana y tardía de tamoxifeno disminuye el número de astrocitos reactivos, de células de microglía reactiva y de células NG2 tras una lesión cerebral penetrante en ratas adultas jóvenes. El raloxifeno tiene el mismo efecto que el tamoxifeno salvo que no reduce el número de astrocitos reactivos en una administración tardía. Los efectos del tamoxifeno y el raloxifeno sobre el número de astrocitos reactivos y células NG2 pueden ser en parte debidos a una disminución en la proliferación celular. Esto sugiere que los SERMs pueden ser buenos candidatos terapéuticos para modular la gliosis.

7- Los agonistas selectivos de los receptores de estrógeno alfa (PPT) y beta (DPN) tienen en general efectos similares sobre la gliosis, lo que sugiere que ambos tipos de receptores pueden mediar las acciones de los compuestos estrogénicos sobre la glía reactiva.

8- Las células NG2 del cerebro de rata expresan receptores de estrógenos alfa. Son, por tanto, diana directa del estradiol.

9- El estradiol no afecta a la posible conversión de células NG2 en astrocitos pero su efecto en el número de astrocitos reactivos podría ser en parte debido a una disminución en el número de progenitores NG2.

10- El estradiol, el tamoxifeno, el raloxifeno, el bazedoxifeno y el ospemifeno disminuyen la glía reactiva en el cerebro lesionado de ratas viejas ovariectomizadas a distintos tiempos, pero un periodo largo de privación de hormonas ováricas disminuye el efecto de algunos de estos compuestos. Esto sugiere que el efecto anti-inflamatorios de los compuestos estrogénicos en el cerebro de las mujeres podría verse afectado por el tiempo transcurrido después de la menopausia.

Bibliografia

1. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, and Wyss-Coray T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.
2. Akiyama H, Itagaki S, and McGeer PL. 1988. Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J Neurosci Res* 20(2):147-57.
3. Albertazzi P, and Sharma S. 2005. Urogenital effects of selective estrogen receptor modulators: a systematic review. *Climacteric* 8:214-20.
4. Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, and Hurn PD. 1998. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 29:159-166.
5. Altomonte M, Pucillo C, and Maio M. 1999. The overlooked "nonclassical" functions of major histocompatibility complex (MHC) class II antigens in immune and nonimmune cells. *J Cell Physiol* 179:251-256.
6. Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
7. Alonso G. 2005. NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: Possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia* 49(3):318-38.
8. Alonso G. 2000. Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia* 31(3):219-31.
9. Alvarez-Buylla A and Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
10. Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K, and Norton WT. 1996. Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16:368-382.
11. Amin Z, Canli T, and Epperson CN. 2005. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. *Behav Cogn Neurosci Rev* 4(1):43-58.
12. Anderson CP, Rozovsky I, Stone DJ, Song Y, Lopez LM, and Finch CE. 2002. Aging and increased hypothalamic glial fibrillary acid protein (GFAP) mRNA in F344 female rats. Dissociation of GFAP inducibility from the luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* 76(2):121-30.
13. Anderson CM, and Nedergaard M. 2003. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci* 26:340-344.
14. Ankeny DP, and Popovich PG. 2008. Mechanisms and implications of adaptive immune responses after traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* In press.
15. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, and Haydon PG. 1998. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
16. Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, and Buno W. 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.

17. Arnett HA, Wang Y, Matsushima GK, Suzuki K, and Ting JP. 2003. Functional genomic analysis of remyelination reveals importance of inflammation in oligodendrocyte regeneration. *J Neurosci* 23:9824-9832.
18. Aronica SM, Kraus WL, and Katzenellenbogen BS. 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(18):8517-21.
19. Asthana S, Baker LD, Craft S, Stanczyk FZ, Veith RC, Raskind MA, and Plymate SR. 2001. High-dose estradiol improves cognition for women with AD: results of a randomized study. *Neurology* 57:605-612.
20. Ashwell K. 1990. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55:219-230.
21. Azcoitia I, Sierra A, and Garcia-Segura LM. 1998. Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport* 9(13):3075-9;
22. Azcoitia I, Sierra A, and Garcia-Segura LM. 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res* 58(6):815-22.
23. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, and Garcia-Segura LM. 2001. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47(4):318-29.
24. Badan I, Buchhold B, Hamm A, Gratz M, Walker LC, Platt D, Kessler Ch, and Popa-Wagner A. 2003. Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(7):845-54.
25. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, and Kreutzberg GW. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
26. Baker AE, Brautigam VM, and Watters JJ. 2004. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 145(11):5021-32.
27. Baracskey KL, Kidd GJ, Miller RH, and Trapp BD. 2007. NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 55(10):1001-10.
28. Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, and Rosenberg PA. 2004. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci* 20(7):1713-26.
29. Beato M, Chavez S, and Truss M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61(4): 240-51.
30. Becher B, Prat A, and Antel JP. 2000. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29:293-304.
31. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, and Holsboer F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51(4):535-41.
32. Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, and Gallo V. 2003. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161: 169-186.

33. Benvenuti S, Ludiani P, Vannelli GB, Gelmini S, Franceschi E, Serio M, and Peri A. 2005. Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures. *J Clin Endocrin Metabol* 90:1775-1782.
34. Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405:187–191.
35. Berthold AA. 1849. Transplantation der Hoden. *Arch Anat Physiol Wiss Med* 16: 42–46.
36. Biewenga E, Cabell L, and Audesirk T. 2005. Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 373:179-183.
37. Bovolenta P, Wandosell F, and Nieto-Sampedro M. 1992. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 94:367-379.
38. Bu J, Akhtar N, and Nishiyama A. 2001. Transient expression of the NG2 proteoglycan by a subpopulation of activated macrophages in an excitotoxic hippocampal lesion. *Glia* 34(4):296-310.
39. Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, and Götz M. 2008. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(9):3581-6.
40. Buffo A, Vosko MR, Ertürk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, and Götz M. 2005. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(50):18183-8.
41. Bruce-Keller AJ. 1999. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 58:191-201.
42. Bruce-Keller AJ, Barger SW, Moss NI, Pham JT, Keller JN, and Nath A. 2001. Proinflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 beta-estradiol. *J Neurochem* 78:1315-1324.
43. Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, and Mattson MP. 2000. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141:3646-3656.
44. Brown JW, Prieto LM, Perez-Stable C, Montoya M, Cappell S, and Fishman LM. 2008. Estrogen and progesterone lower cyclin B1 AND D1 expression, block cell cycle in G2/M, and trigger apoptosis in human adrenal carcinoma cell cultures. *Horm Metab Res* 40(5):306-10.
45. Bushong EA, Martone ME, and Ellisman MH. 2004. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22:73-86.
46. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, and Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
47. Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM, and Berry M. 1999. Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia* 26(1):84-91.
48. Butt AM, Kiff J, Hubbard P, and Berry M. 2002. Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* 31:551–565.
49. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, and Sofroniew MV. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and

neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.

50. Byrnes KR, Stoica BA, Fricke S, Di Giovanni S, and Faden AI. 2007. Cell cycle activation contributes to post-mitotic cell death and secondary damage after spinal cord injury. *Brain* 130(Pt 11):2977-92.

51. Cadelli DS, Bandtlow CE, and Schwab ME. 1992. Oligodendrocyte- and myelin-associated inhibitors of neurite outgrowth: their involvement in the lack of CNS regeneration. *Exp Neurol* 115:189-192.

52. Carbonell AL and Boya J. 1988. Ultrastructural study on meningeal regeneration and meningo-glial relationships after cerebral stab wound in the adult rat. *Brain Res* 439:337-344.

53. Carrer HF, and Cambiasso MJ. 2002. Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cell Mol Neurobiol* 22(5-6):479-500.

54. Carson-Jurica MA, Schrader WT, and O'Malley BW. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11(2):201-20.

55. Catalano MG, Pfeffer U, Raineri M, Ferro P, Curto A, Capuzzi P, Corno F, Berta L, and Fortunati N. 2000. Altered expression of androgen-receptor isoforms in human coloncancer tissues. *Int J Cancer* 86:325-330.

56. Cavanaugh JB. 1979. The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J Anat* 106:471-487.

57. Cenci di Bello I, Dawson MRL, Levine JM, and Reynolds R. 1999. Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation. *J Neurocytol* 28:366 –381.

58. Cernak I, Stoica B, Byrnes KR, Di Giovanni S, and Faden AI. 2005. Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma. *Cell Cycle* 4(9):1286-93.

59. Cevolani D, Bentivoglio, M, and Strocchi P. 2001. Glial reaction to volkensin-induced selective degeneration of central neurons. *Brain Res Bull* 54:353-361.

60. Chamak B, Morandi V, and Mallat M. 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res* 38:221-233.

61. Chatterjee N, Stegmüller J, Schätzle P, Karram K, Koroll M, Werner HB, Nave KA, and Trotter J. 2008. Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J Biol Chem* 283(13):8310-7.

62. Chen J, Adachi N, Liu K, Arai T. 1998. The effects of 17beta-estradiol on ischemia-induced neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Neuroscience* 87:817-22.

63. Chen LW, Zhang JP, Kwok-Yan Shum D, and Chan YS. 2006. Localization of nerve growth factor, neurotrophin-3, and glial cell line-derived neurotrophic factor in nestin-expressing reactive astrocytes in the caudate-putamen of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/Bl mice. *J Comp Neurol* 497(6):898-909.

64. Chen Y and Swanson RA. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.

65. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, and Shaul PW. 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103(3):401-6.

66. Chen ZJ, Ughrin Y, and Levine JM. 2002. Inhibition of axon growth by oligodendrocyte precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 20(1):125-39.
67. Cheng B, Christakos S, and Mattson MP. 1994. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-153.
68. Chirumamilla S, Sun D, Bullock MR, and Colello RJ. 2002. Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J Neurotrauma*. 2002 Jun;19(6):693-703.
69. Chowen JA, Torres-Alemán I, and García-Segura LM. 1992. Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 56(6):895-901.
70. Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG and García-Segura LM. 2004. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol* 61:209-221.
71. Coksaygan T, Magnus T, Cai J, Mughal M, Lepore A, Xue H, Fischer I, and Rao MS. 2006. Neurogenesis in Talpha-1 tubulin transgenic mice during development and after injury. *Exp Neurol* 197(2):475-85.
72. Coquelin A, and Desjardins C. 1982. Luteinizing hormone and testosterone secretion in young and old male mice. *Am J Physiol* 243:257–263.
73. Corasaniti MT, Amantea D, Russo R, Piccirilli S, Leta A, Corazzari M, Nappi G, and Bagetta G. 2005. 17beta-estradiol reduces neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 in the neocortex of rat. *Neurotoxicology* 26(5):893-903.
74. Cordeau P Jr, Lalancette-Hébert M, Weng YC, and Kriz J. 2008. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke* 39(3):935-42.
75. Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, and Clark AJ. 2001. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* 34:272-282.
76. Curry JJ 3rd, and Heim LM. 1966. Brain myelination after neonatal administration of oestradiol. *Nature* 209(5026):915-6.
77. Cushman M, Costantino JP, Tracy RP, Song K, Buckley L, Roberts JD, and Krag DN. 2001. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: Suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(2):255-61.
78. Davis EJ, Foster TD, and Thomas WE. 1994. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34:73-78.
79. Day JR, Laping NJ, McNeill TH, Schreiber SS, Pasinetti G, and Finch CE. 1990. Castration enhances expression of glial fibrillary acidic protein and sulfated glycoprotein-2 in the intact and lesion-altered hippocampus of the adult male rat. *Mol Endocrinol* 4:1995-2002.
80. Dayspring T, Qu Y, and Keech C. 2006. Effects of raloxifene on lipid and lipoprotein levels in postmenopausal osteoporotic women with and without hypertriglyceridemia. *Metabolism* 55(7):972-9.
81. Dehn D, Burbach GJ, Schäfer R, and Deller T. 2006. NG2 upregulation in the denervated rat fascia dentata following unilateral entorhinal cortex lesion. *Glia* 53(5):491-500.

82. Del Río-Hortega P. 1919. El tercer elemento de los centros nerviosos. *Bol Soc Esp Biol* 9, 69-120.
83. Del Río-Hortega P. 1920. La microglía y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab Lab Invest Biol* XVIII:37-82.
84. De Nicola AF, Gonzalez SL, Labombarda F, Deniselle MC, Garay L, Guennoun R, and Schumacher M. 2006. Progesterone treatment of spinal cord injury: Effects on receptors, neurotrophins, and myelination. *J Mol Neurosci* 28(1):3-15.
85. Dhandapani KM, and Brann DW. 2007. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol* 42(1-2):70-5.
86. Ding S, Fellin T, Zhu Y, Lee SY, Auberson YP, Meaney DF, Coulter DA, Carmignoto G, and Haydon PG. 2007. Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J Neurosci* 27(40):10674-84.
87. Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, and Stein DG. 2005. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 22(1):106-18.
88. Dluzen D and Horstink M. 2003. Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine* 21:67-75.
89. Dou C, and Levine JM. 1994. Inhibition of neurite outgrowth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 14:7616–7628.
90. Dong Y, and Benveniste EN. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
91. Dougherty KD, Dreyfus CF, and Black IB. 2000. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B):574-85.
92. Drew PD, and Chavis JA. 2000. Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J Neuroimmunol* 111:77-85.
93. Dringen R, Gebhardt R, and Hamprecht B. 1993. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623:208-214.
94. Du B, Ahmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohshima C, Igarashi H, Mori-Abe A, Saitoh M, Ohta T, Ohishi A, Doshida M, Tezuka N, Takahashi T, and Kurachi H. 2004. Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *J Endocrin* 183:605-615.
95. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, and Wise PM. 1998. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1253–1258.
96. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, and Wise PM. 2001 Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1952–1957.
97. Eddleston M, and Mucke L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
98. Eeckhoute J, Carroll JS, Geistlinger TR, Torres-Arzayus MI, and Brown M. 2006. A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev* 20(18):2513-26.

99. Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, Kato S, and Kawashima H. 1997. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line Biochem Biophys Res Commun 235(1):99-102.
100. Ellison JA, and de Vellis J. 1995. Amoeboid microglia expressing GD3 ganglioside are concentrated in regions of oligodendrogenesis during development of the rat corpus callosum. Glia 14:123-132.
101. Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240:889-895.
102. Fagan AM, and Gage FH. 1994. Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. Neuroscience 58:705-725.
103. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, and Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev 52:513-556.
104. Farfara D, Lifshitz V, and Frenkel D. 2008. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. J Cell Mol Med 12(3):762-80.
105. Farhat MY, Abi-Younes S, Dingaam B, Vargas R, and PW R. 1996. Estradiol increases cyclic adenosine monophosphate in rat pulmonary vascular smooth muscle cells by a nongenomic mechanism. J Pharmacol Exp Ther 276(2):652-657.
106. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, and Sofroniew MV. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci 24:2143-2155.
107. Fawcett JW, and Asher RA. 1999. The glial scar and central nervous system repair. Brain Res Bull 49:377-391.
108. Feng Y, Fratkins JD, and LeBlanc MH. 2004. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Eur J Pharmacol 485:65-74.
109. Finsen BR, Jorgensen MB, Diemer NH, and Zimmer J. 1993. Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. Glia 7:41-49.
110. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, Smith R, Begovic M, Dimitrov NV, Margolese RG, Kardinal CG, Kavanah MT, Fehrenbacher L, and Oishi RH. 1999. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. Lancet 353(9169):1993-2000.
111. Fitch MT, and Silver J. 2008. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. Exp Neurol 209(2):294-301.
112. Fix C, Jordan C, Cano P, and Walker WH. 2004. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. Proc Natl Acad Sci USA 101(30):10919-24.
113. Flores C, Salmaso N, Cain S, Rodaros D, and Stewart J. 1999. Ovariectomy of adult rats leads to increased expression of astrocytic basic fibroblast growth factor in the ventral tegmental area and in dopaminergic projection regions of the entorhinal and prefrontal cortex. J Neurosci 19(19):8665-73.
114. Flurkey K, Gee DM, Sinha YN, Wisner JR Jr, and Finch CE. 1982. Age effects on luteinizing hormone, progesterone and prolactin in proestrous and acyclic C57BL/6j mice. Biol Reprod 26(5):835-46.

115. Foradori CD, Weiser MJ, and Handa RJ. 2008. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29(2):169-81.
116. Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, and Sedgwick JD. 1996. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med* 184:1737-1745.
117. Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, and Sedgwick JD. 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154:4309-4321.
118. Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, and Berger TW. 1999. 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81(2):925-9.
119. Francucci CM, Daniele P, Iori N, Camilletti A, Massi F, and Boscaro M. 2005. Effects of raloxifene on body fat distribution and lipid profile in healthy post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 28(7):623-31.
120. Frisen J, Haegerstrand A, Fried K, Piehl F, Cullheim S, and Risling M. 1994. Adhesive/repulsive properties in the injured spinal cord: relation to myelin phagocytosis by invading macrophages. *Exp Neurol* 129:183-193.
121. Frye CA, and McCormick CM. 2000. Androgens are neuroprotective in the dentate gyrus of adrenalectomized female rats. *Stress* 3(3):185-94.
122. Frye CA, Rhodes ME, and Dudek B. 2005. Estradiol to aged female or male mice improves learning in inhibitory avoidance and water maze tasks. *Brain Res* 1036(1-2):101-8.
123. Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, and Pawluski JL. 2006. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus* 16(3):225-32.
124. Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR, and Vaccarino FM. 2006. Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J Neurosci* 26(33):8609-21.
125. García-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, and García-Segura LM. 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res* 628:271-278.
126. García-Estrada J, Luquin S, Fernández AM, and García-Segura LM. 1999. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci* 17:145-151.
127. Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, and Garcia-Segura LM. 2005. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev* 48(2):273-86.
128. García-Ovejero D, Veiga S, García-Segura LM, and DonCarlos LL. 2002. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol* 450:256-271.
129. Garcia-Segura LM. 2008. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20(6):705-12.
130. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, and DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63(1):29-60.
131. Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, and Chowen JA. 1998. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* 9(4):593-7.

132. Garcia-Segura LM, and Melcangi RC. 2006. Steroids and glial cell function. *Glia* 54: 485–498.
133. Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, and Chowen JA. 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40:574-584.
134. Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, and Hutchison JB. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89:567–578.
135. Gao Q, Li Y, Shen L, Zhang J, Zheng X, Qu R, Liu Z, and Chopp M. 2008. Bone marrow stromal cells reduce ischemia-induced astrocytic activation in vitro. *Neuroscience* 152(3):646-55.
136. Gao T and McPhaul MJ. 1998. Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* 12:654-663.
137. Gates MA, and Dunnett SB. 2001. The influence of astrocytes on the development, regeneration and reconstruction of the nigrostriatal dopamine system. *Restor Neurol Neurosci* 19:67-83.
138. Gennari L, Merlotti D, Valleggi F, Martini G, and Nuti R. 2007. Selective estrogen receptor modulators for postmenopausal osteoporosis: current state of development. *Drugs Aging* 24(5):361-79.
139. Gensert JM, and Goldman JE. 1997. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19:197–203.
140. Gerstner B, Siffringer M, Dzielko M, Schüller A, Lee J, Simons S, Obladen M, Volpe JJ, Rosenberg PA, and Felderhoff-Mueser U. 2007. Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol* 61(6):562-73.
141. Ghirnikar RS, Lee YL, He TR, and Eng LF. 1996. Chemokine expression in rat stab wound brain injury. *J Neurosci Res* 46:727-733.
142. Ghoumari AM, Baulieu EE, and Schumacher M. 2005. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience*. 2005;135(1):47-58.
143. Giulian D, Haverkamp LJ, Li J, Karshin WL, Yu J, Tom D, Li X, and Kirkpatrick JB. 1995. Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem Int* 27:119-137.
144. Giulian D, Vaca K, and Noonan CA. 1990. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 250:1593-1596.
145. Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, and Lachman LB. 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci* 8:709-714.
146. Gorski RA. 2002. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Adv Exp Med Biol* 511:57-70.
147. Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, and McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10:1286–1291.
148. Gouras GK, Xu H, Gross RS, Greenfield JP, Hai B, Wang R, and Greengard P. 2000. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(3):1202-5.

149. Gottardis MM, and Jordan VC. 1987. Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model *Cancer Res* 47(15):4020-4.
150. Graeber MB, Streit WJ, and Kreutzberg GW. 1988. The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells in situ. *J Neurocytol* 17(4):573-80.
151. Guvakova MA, and Surmacz E. 1997. Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) signaling pathway in breast cancer cells *Cancer Res* 57(13):2606-10.
152. Guzmán CB, Deighton-Collins S, Martinez A, Kleerekoper M, Zhao C, Benjamins JA, and Skafar DF. 2005. Activity of estradiol and selective estrogen receptor modulators in the mouse N20.1 oligodendrocyte/astrocytes cell line. *Neuro Endocrinol Lett* 26(5):526-32.
153. Hajszan T, Milner TA, and Leranth C. 2007. Sex steroids and the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:399-415.
154. Hall JM, and McDonnell DP. 1999. The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566-5578.
155. Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, and LeBlanc A. 2001. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J Neurochem* 77(5):1319-26.
156. Hampton DW, Asher RA, Kondo T, Steeves JD, Ramer MS, and Fawcett JW. 2007. A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo. *Eur J Neurosci* 26(11):3024-35.
157. Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJ, and Fawcett JW. 2004. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127(4):813-20.
158. Hatton WJ, and Von Bartheld CS. 1999. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol* 409:169-186.
159. Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M, and Stoeckel ME. 1998. Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res* 794:211-224.
160. Heemers HV, and Tindall DJ. 2007. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28(7):778-808.
161. Heinlein CA, and Chang C. 2002. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16:2181-2187.
162. Henderson VW. 1997. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* 48:S27-S35.
163. Herx LM, Rivest S, and Yong VW. 2000. Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 β is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J Immunol* 165:2232-2239.
164. Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, and Thoenen H. 1987. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8735-8739.

165. Hirahara Y, Matsuda KI, Gao W, Arvanitis DN, Kawata M, and Boggs JM. 2008. The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia* En prensa.
166. Hoehn BD, Palmer TD, and Steinberg GK. 2005. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 36(12):2718-24.
167. Holmberg E, Zhang SX, Sarmiere PD, Kluge BR, White JT, and Doolen S. 2008. Statins decrease chondroitin sulfate proteoglycan expression and acute astrocyte activation in central nervous system injury. *Exp Neurol* En prensa.
168. Horner PJ, Thallmair M, and Gage FH. 2002. Defining the NG2- expressing cell of the adult CNS. *J Neurocytol* 31:469–480.
169. Hong SH, Choi HB, Kim SU, and McLarnon JG. 2006. Mitochondrial ligand inhibits store-operated calcium influx and COX-2 production in human microglia. *J Neurosci Res* 83:1293-1298.
170. Hong S, Kang UJ, Isacson O, and Kim KS. 2008. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J Neurochem* 104(2):316-24.
171. Horn KP, Busch SA, Hawthorne AL, van Rooijen N, and Silver J. 2008. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J Neurosci* 28(38):9330-41.
172. Horsburgh K, Macrae IM, and Carswell H. 2002. Estrogen is neuroprotective via an apolipoprotein E-dependent mechanism in a mouse model of global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(10):1189-95.
173. Howard CV, and Reed MG. 1998. *Unbiased Stereology*. Ed Bios Scientific Publishers (UK).
174. Hozumi I, Chiu FC, and Norton WT. 1990. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res* 524:64-71.
175. Hubbard P, Berry M, and Butt A. 2000. NG2 glia (oligodendrocyte progenitor cells) in the adult rat spinal cord. *J Anat* 200(2):213-214.
176. Hui AM, Zhang W, Chen W, Xi D, Purow B, Friedman GC, and Fine HA. 2004. Agents with selective estrogen receptor (ER) modulator activity induce apoptosis in vitro and in vivo in ER-negative glioma cells. *Cancer Res* 64(24):9115-23.
177. Huynh HT, and Pollak M. 1993. Insulin-like growth factor I gene expression in the uterus is stimulated by tamoxifen and inhibited by the pure antiestrogen ICI 182780. *Cancer Res* 53(23):5585-8.
178. Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, and Makela S. 1996. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifeno. *Cancer Res* 56(17):3954-60.
179. Innocenti GM, Clarke S, and Koppel H. 1983. Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. *Brain Res* 313:55-66.
180. Inoue K. 2002. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156-163.

181. Janeczko K. 1993. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci* 11:139-147.
182. Jensen EV. 1962. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* 6:47-59.
183. Jensen EV, and Jordan VC. 2003. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9(6):1980-9.
184. Jensen MB, Finsen B, and Zimmer J. 1997. Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with bloodbrain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol* 143:103-116.
185. Jin Y, McEwen ML, Ghandour MS, and Springer JE. 2004. Overexpression of XIAP inhibits apoptotic cell death in an oligodendroglial cell line. *Cell Mol Neurobiol* 24(6):853-63.
186. Jochems C, Islander U, Kallkopf A, Lagerquist M, Ohlsson C, and Carlsten H. 2007. Role of raloxifene as a potent inhibitor of experimental postmenopausal polyarthritis and osteoporosis. *Arthritis Rheum* 56(10):3261-70.
187. Jones KJ, Brown TJ, and Damaser M. 2001. Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):372-82.
188. Jones KJ, Kinderman NB, and Oblinger MM. 1997. Alterations in glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA levels in the hamster facial motor nucleus: effects of axotomy and testosterone. *Neurochem Res* 22:1359-1366.
189. Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, and Tuszynski MH. 2002. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22(7):2792-803.
190. Jordan VC. 2003. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J Med Chem* 46(7):1081-111.
191. Jordan VC. 1976. Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata *Eur J Cancer* 12(6):419-24.
192. Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH, and Zimmer J. 1993. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 120:70-88.
193. Jover-Mengual T, Zukin RS, and Etgen AM. 2007. MAPK signaling is critical to estradiol protection of CA1 neurons in global ischemia. *Endocrinology* 148(3):1131-43.
194. Juliet PA, Mao X, and Del Bigio MR. 2008. Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. *Brain Res* 1210:230-9.
195. Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL, and Baulieu EE. 1992. Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:621-631.
196. Kallio A, Guo T, Lamminen E, Seppänen J, Kangas L, Väänänen HK, and Härkönen P. 2008. Estrogen and the selective estrogen receptor modulator (SERM) protection against cell death in estrogen receptor alpha and beta expressing U2OS cells. *Mol Cell Endocrinol* 289(1-2):38-48.
197. Kato H, Takahashi A, and Itoyama Y. 2003. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* 60(3):215-21.

198. Keirstead HS, Levine JM, and Blakemore WF. 1998. Response of the oligodendrocyte progenitor cell (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia* 22:161–170.
199. Kelly MJ, and Levin ER. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12(4):152-6.
200. Kelly MJ, and Ronnekleiv OK. 2008. Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol* 290(1-2):14-23.
201. Khanna R, Roy L, Zhu X, and Schlichter LC. 2001. K⁺ channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C796-C806.
202. Kielian T. 2008. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J Neurochem* 106(3):1000-16.
203. Kim SU, and de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
204. Kimelberg HK, Jin Y, Charniga C, and Feustel PJ. 2003. Neuroprotective activity of tamoxifen in permanent focal ischemia. *J Neurosurg* 99:138-142.
205. Kinouchi R, Takeda M, Yang L, Wilhelmsson U, Lundkvist A, Pekny M, and Chen DF. 2003. Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. *Nat Neurosci* 6:863-868.
206. Kirchhoff F, Dringen R, and Giaume C. 2001. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:159-169.
207. Kirvell S, and Butt A. 2002. Response of NG2 glia (oligodendrocyte progenitor cells) to platelet derived growth factor in the rat anterior medullary velum. *J Anat* 200(2):206.
208. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, and Ryffel GU. 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46(7):1053-61.
209. Klein MA, Moller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, and Raivich G. 1997. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19:227-233.
210. Kleinman D, Karas M, Danilenko M, Arbell A, Roberts CT, LeRoith D, Levy J, and Sharoni Y. 1996. Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased insulin-like growth factor (IGF)-I induced tyrosine phosphorylation and reduction in IGF binding proteins. *Endocrinology* 137(3):1089-95.
211. Knerlich F, Schilling L, Gorlach C, Wahl M, Ehrenreich H, and Siren AL. 1999. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 β and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 68:73-87.
212. Kohama SG, Goss JR, McNeill TH, and Finch CE. 1995. Glial fibrillary acidic protein mRNA increases at proestrus in the arcuate nucleus of mice. *Neurosci Lett* 183:164–166.
213. Komi J, Lankinen KS, DeGregorio M, Heikkinen J, Saarikoski S, Tuppurainen M, Halonen K, Lammintausta R, Väänänen K, Ylikorkala O, and Erkkola R. 2006. Effects of ospemifene and raloxifene on biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 24(4):314-8.
214. Korach KS. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 266(5190):1524-7.

215. Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
216. Kreutzberg GW, and Barron KD. 1978. 5'-Nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction. *J Neurocytol* 7:601-610.
217. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, and Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12):5925-30.
218. Laabs TL, Wang H, Katagiri Y, McCann T, Fawcett JW, and Geller HM. 2008. Inhibiting glycosaminoglycan chain polymerization decreases the inhibitory activity of astrocyte-derived chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 28(11):2688-9.
219. Labombarda F, Gonzalez S, Gonzalez Deniselle MC, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, and De Nicola AF. 2006. Progesterone increases the expression of myelin basic protein and the number of cells showing NG2 immunostaining in the lesioned spinal cord. *J Neurotrauma* 23(2):181-92.
220. Ladeby R, Wirenfeldt M, García-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, and Finsen B. 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 48:196-206.
221. Lai AY, and Todd KG. 2008. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56(3):259-70.
222. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, and Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
223. Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye KF, Ingram DK, and Mouton PR. 2003. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. *Neuroscience* 121:659-666.
224. Levin ER. 1999. Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 10(9):374-377.
225. Levine JM. 1994. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* 14:4716–4730.
226. Levine JM, Enquist LW, Card JP. 1998. Reactions of oligodendrocyte precursor cells to alpha herpesvirus infection of the central nervous system. *Glia* 23:316 –328.
227. Levine JM, and Nishiyama A. 1996. The NG2 chondroitin sulphate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol* 3:245–259.
228. Levine JM, and Reynolds R. 1999. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 160:333–347.
229. Levine JM, Reynolds R, and Fawcett JW. 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24(1):39-47.
230. Le Roux PD, and Reh TA. 1996. Reactive astroglia support primary dendritic but not axonal outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *Exp Neurol* 137(1):49-65.
231. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, and Levison SW. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-1100.

232. Lieberman BA. 1997. The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7(1-2):43-59.
233. Lin SC, and Bergles DE. 2004a. Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 47:290-298.
234. Lin SC, and Bergles DE. 2004b. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci* 7:24-32.
235. Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, and Ohlsson C. 2003. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17(2):203-8.
236. Lindsay RM. 1986. Reactive gliosis. En Fedoroff S and Vernadakis A. (eds) *Astrocytes*. Vol. 3. Academic Press, Orlando, pp. 231-262.
237. Li R, Shen Y, Yang LB, Lue LF, Finch C, and Rogers J. 2000. Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex. *J Neurochem* 75:1447-1454.
238. Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, and Brandon NJ. 2008. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 11(3):334-43.
239. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, and Kushner PJ. 2002. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 277(27):24353-24360.
240. Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, and Baird A. 1994. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 6:355-363.
241. Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, and Baird A. 1992. A time course for the focal elevation of synthesis of basic fibroblast growth factor and one of its high-affinity receptors (fgf) following a localized cortical brain injury. *J Neurosci* 12:3828-3837.
242. Lotan M, Solomon A, Ben Bassat S, and Schwartz M. 1994. Cytokines modulate the inflammatory response and change permissiveness to neuronal adhesion in injured mammalian central nervous system. *Exp Neurol* 126:284-290.
243. MacLusky NJ, Hajszan T, Prange-Kiel J, and Leranth C. 2006. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* 138(3):957-65.
244. Magistretti PJ. 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209(Pt 12):2304-11.
245. Magnus T, Carmen J, Deleon J, Xue H, Pardo AC, Lepore AC, Mattson MP, Rao MS, and Maragakis NJ. 2008. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *Glia* 56(2):200-8.
246. Magnus T, Coksaygan T, Korn T, Xue H, Arumugam TV, Mughal MR, Eckley DM, Tang SC, Detolla L, Rao MS, Cassiani-Ingoni R, and Mattson MP. Evidence that nucleocytoplasmic Olig2 translocation mediates brain-injury-induced differentiation of glial precursors to astrocytes. *J Neurosci Res* 85(10):2126-37.
247. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, and Matsushima GK. 2001. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21:7046-7052.

248. Marin-Husstege M, Muggironi M, Raban D, Skoff RP, and Casaccia-Bonnel P. 2004. Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones. *Dev Neurosci* 26(2-4):245-54.
249. Massey JM, Amps J, Viapiano MS, Matthews RT, Wagoner MR, Whitaker CM, Alilain W, Yonkof AL, Khalyfa A, Cooper NG, Silver J, and Onifer SM. 2008. Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury creates a barrier to axonal regeneration overcome by chondroitinase ABC and neurotrophin-3. *Exp Neurol* 209(2):426-45.
250. McAsey ME, Cady C, Jackson LM, Li M, Randall S, Nathan BP, and Struble RG. 2006. Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: brain apolipoprotein E and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Exp Neurol* 197(1):197-205.
251. McEwen BS, and Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:279-307.
252. McEwen BS, Gould E, Orchinik M, Weiland NG, and Woolley CS. 1995. Oestrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes. *Ciba Found Symp* 191:52-66.
253. McGeer PL, and McGeer EG. 2001. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 22:799-809.
254. McKenna NJ, Lanz RB, and O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-44.
255. McKenna NJ, and O'Malley BW. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-74.
256. Medina JM, Giaume C, and Tabernero A. 1999. Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 468:361-371.
257. Mehta SH, Dhandapani KM, De Sevilla LM, Webb RC, Mahesh VB, and Brann DW. 2003. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology* 77(1):44-50.
258. Melcangi RC, Magnaghi V, and Martini L. 1999. Steroid metabolism and effects in central and peripheral glial cells. *J Neurobiol* 40:471-483.
259. Menet V, Prieto M, Privat A, and Ribotta M. 2003. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8999-9004.
260. Menet V, Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, and Privat A. 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21:6147-6158.
261. Mendelsohn ME, and Karas RH. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340(23):1801-11.
262. Michels G, and Hoppe UC. 2008. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29(2):182-98.
263. Michael H, Härkönen PL, Kangas L, Väänänen HK, and Hentunen TA. 2007. Differential effects of selective oestrogen receptor modulators (SERMs) tamoxifen, ospemifene and raloxifene on human osteoclasts in vitro. *Br J Pharmacol* 151(3):384-95.

264. Minghetti L, and Levi G. 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 54:99-125.
265. Misiewicz B, Griebler C, Gomez M, Raybourne R, Zelazowska E, Gold PW, and Sternberg EM. 1996. The estrogen antagonist tamoxifen inhibits carrageenan induced inflammation in LEW/N female rats. *Life Sci* 58(16):281-6.
266. Mission JP, Takahashi T, and Caviness VS Jr. 1991. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4:138-148.
267. Moller T, Hanisch UK, and Ransom BR. 2000. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 75:1539-1547.
268. Moller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A, and Kettenmann H. 1997. Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling in mouse microglia. *J Neurosci* 17:615-624.
269. Moon LD, and Fawcett JW. 2001. Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2. *Eur J Neurosci* 14:1667-1677.
270. Moore S, and Thanos S. 1996. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol* 48:441-460.
271. Morales LB, Loo KK, Liu HB, Peterson C, Tiwari-Woodruff S, and Voskuhl RR. 2006. Treatment with an estrogen receptor alpha ligand is neuroprotective in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 26(25):6823-33.
272. Morest DK, and Silver J. 2003. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 43:6-18.
273. Morgenstern DA, Asher RA, Naidu M, Carlstedt T, Levine JM, and Fawcett JW. 2003. Expression and glycanation of the NG2 proteoglycan in developing, adult, and damaged peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci* 24:787-802.
274. Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, and Town T. 2008. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. *Stroke* 39(7):2114-21.
275. Mourlevat S, Troadec JD, Ruberg M, and Michel PP. 2003. Prevention of dopaminergic neuronal death by cyclic AMP in mixed neuronal/glial mesencephalic cultures requires the repression of presumptive astrocytes. *Mol Pharmacol* 64:578-586.
276. Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, and Nerenberg MI. 1991. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol* 3(5):465-74.
277. Myer DJ, Gurkoff G, Lee SM, Hovda DA, and Sofroniew MV. 2006. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129:2761-2772.
278. Nadler Y, Alexandrovich A, Grigoriadis N, Hartmann T, Rao KS, Shohami E, and Stein R. 2008. Increased expression of the gamma-secretase components presenilin-1 and nicastrin in activated astrocytes and microglia following traumatic brain injury. *Glia* 56(5):552-67.
279. Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, and Kurachi Y. 1995. 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 294:625-635.

280. Nakajima K, Tohyama Y, Maeda S, Kohsaka S, and Kurihara T. 2007. Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochem Int* 50(6):807-20.
281. Nakajima K, Yamamoto S, Kohsaka S, Kurihara T. 2008. Neuronal stimulation leading to upregulation of glutamate transporter-1 (GLT-1) in rat microglia in vitro. *Neurosci Lett* 436(3):331-4.
282. Nave KA, and Trapp BD. 2008. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31:535-61.
283. Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, and Motta M. 2004. Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites. *J Endocrinol Invest* 27:120–127.
284. Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, and Finch CE. 1992. Differential contributions of ovarian and extraovarian factors to age-related reductions in plasma estradiol and progesterone during the estrous cycle of C57BL/6J mice. *Endocrinology* 130:805–810.
285. Nemere I, and Farach-Carson MC. 1998. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens *Biochem Biophys Res Commun* 248(3):443-9.
286. Ness JK, Valentino M, McIver SR, and Goldberg MP. 2005. Identification of oligodendrocytes in experimental disease models. *Glia* 50: 3221-3228.
287. Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542.
288. Ng YK, and Ling EA. 1997. Induction of major histocompatibility class II antigen on microglial cells in postnatal and adult rats following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Neurosci Res* 28:111-118.
289. Niehaus A, Stegmüller J, Diers-Fenger M, and Trotter J. 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci* 19:4948–4961.
290. Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, and Brinton RD. 2006. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci* 7:74.
291. Nishiyama A, Chang A, and Trapp BD. 1999. NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(11):1113-24.
292. Nishiyama A, Dahlin KJ, Prince JT, Johnstone SR, and Stallcup WB. 1991. The primary structure of NG2, a novel membranespanning proteoglycan. *J Cell Biol* 114:359–371.
293. Nishiyama A, Yang Z, and Butt A. 2005. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207:687–694.
294. Nishiyama A, Yu M, Drazba JA, and Tuohy VK. 1997. Normal and reactive NG2 glial cells are distinct from resting and activated microglia. *J Neurosci Res* 48:299–312.
295. Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, and Kriegstein AR. 2007. Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found Symp* 288:59-73.
296. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, and Brosnan CF. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17:877-885.
297. Okada M, Murase K, Makino A, Nakajima M, Kaku T, Furukawa S, and Furukawa Y. 2008. Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. *Biomed Res* 29(3):163-70.

298. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-7.
299. Ong WY, Levine JM. 1999. A light and electron microscopic study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan-positive oligodendrocyte precursor cells in the normal and kainatelesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 92, 83–95.
300. Ormerod BK, and Galea LA. 2001. Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience* 102(2):369-79.
301. Paganini-Hill A. 2001. Hormone replacement therapy and stroke: risk, protection or no effect? *Maturitas* 38:243-261.
302. Paganini-Hill A, and Henderson VW. 1996. Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 156:2213-2217.
303. Paintlia MK, Paintlia AS, Khan M, Singh I, and Singh AK. 2008. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures. *J Neurochem* 105(3):956-70.
304. Pang Y, Zheng B, Fan LW, Rhodes PG, and Cai Z. 2007. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNF α -induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. *Glia* 55(11):1099-107.
305. Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, and Stournaras C. 2003. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol* 17(5):870-81.
306. Papasozomenos SC. 1997. The heat shock-induced hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(13):6612-7.
307. Parkening TA, Collins TJ, and Smith ER. 1982. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol Aging* 3:31–35.
308. Paxinos G, and Watson C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
309. Pekny M, and Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.
310. Pelayo I, Haya J, De la Cruz JJ, Seco C, Bugella JI, Diaz JL, Bajo JM, and Repolles M. 2008. Raloxifene plus ossein-hydroxyapatite compound versus raloxifene plus calcium carbonate to control bone loss in postmenopausal women: A randomized trial. *Menopause* En prensa.
311. Perea G, and Araque A. 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25(9):2192-203.
312. Perea G, and Araque A. 2006. Synaptic information processing by astrocytes. *J Physiol Paris* 99(2-3):92-7.
313. Perea G, and Araque A. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317(5841):1083-6.

314. Peters A. 2004. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J Neurocytol* 33:345–357.
315. Peterson RS, Lee DW, Fernando G, and Schlinger BA. 2004. Radial glia Express aromatase in the injured zebra finch brain. *J Comp Neurol* 475:261-269.
316. Peterson RS, Saldanha CJ, and Schlinger BA. 2001. Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol* 13:317-323.
317. Pettersson K, Delaunay F, and Gustafsson JÅ. 2000. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signalling. *Oncogene* 19:4970-4978.
318. Perry VH, Hume DA, and Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15(2):313-26.
319. Perry VH, and Gordon S. 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11(6):273-7.
320. Pietras RJ, Nemere I, and Szego CM. 2001. Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine* 14(3):417-27.
321. Pietras RJ, and Szego CM. 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265(5589):69-72.
322. Pietras RJ, and Szego CM. 1979. Estrogen receptors in uterine plasma membrane. *J Steroid Biochem* 11(4):1471-83.
323. Pietras RJ, and Szego CM. 1980. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J* 191(3):743-60.
324. Pietras RJ, and Szego CM. 1984. Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1):84-91.
325. Pike CJ, Nguyen TV, Ramsden M, Yao M, Murphy MP, and Rosario ER. 2008. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Horm Behav* 53(5):693-705.
326. Platania P, Laureanti F, Bellomo M, Giuffrida R, Giuffrida-Stella AM, Catania MV, and Sortino MA. 2003. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the spinal cord during postnatal development: localization in glial cells. *Neuroendocrinology* 77(5):334-40.
327. Pluschke G, Vanek M, Evans A, Dittmar T, Schmid P, Itin P, Filardo EJ, and Reisfeld RA. 1996 Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9710–9715.
328. Polazzi E, and Contestabile A. 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13:221-242.
329. Polazzi E, Gianni T, and Contestabile A. 2001. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. *Glia* 36:271-280.
330. Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, and Kessler C. 2007. Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathol* 113(3):277-93.

331. Popovich PG, Wei P, and Stokes BT. 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377:443-464.
332. Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, and Houle JD. 1997. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 148:433-443.
333. Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, and Arterburn JB. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109(3-5):350-3.
334. Qu Q, Zheng H, Dahllund J, Laine A, Cockcroft N, Peng Z, Koskinen M, Hemminki K, Kangas L, Väänänen K, and Härkönen P. 2000. Selective estrogenic effects of a novel triphenylethylene compound, FC1271a, on bone, cholesterol level, and reproductive tissues in intact and ovariectomized rats. *Endocrinology* 141(2):809-20.
335. Quesada A, Lee BY, and Micevych PE. 2008. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* 68(5):632-44.
336. Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Krust A, Graham SM, Murphy SJ, Korach KS, Chambon P, Scanlan TS, Rønnekleiv OK, and Kelly MJ. 2006. A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Neurosci* 26(21):5649-55.
337. Rabbani O, Panickar KS, Rajakumar G, King MA, Bodor N, Meyer EM, and Simpkins JW. 1997. 17 beta-estradiol attenuates fimbrial lesion-induced decline of ChAT-immunoreactive neurons in the rat medial septum. *Exp Neurol* 146(1):179-86.
338. Raghupathi R. 2004. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 14(2):215-22.
339. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, and Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
340. Ramirez VD, Zheng J, and Siddique KM. 1996. Membrane receptors for estrogen, progesterone, and testosterone in the rat brain: fantasy or reality. *Cell Mol Neurobiol* 16(2):175-98.
341. Ramírez-Expósito MJ, and Martínez JM. 1998. Estructura y funciones de la microglía en el sistema nervioso central. Respuesta a procesos degenerativos. *Rev Neurol* 26:600-611.
342. Redwine JM, and Armstrong RC. 1998. *In vivo* proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFalphaR during early remyelination. *J Neurobiol* 37:413-428.
343. Ricchiuti V, Lian C, Oestreicher E, Tran L, Stone J, Yao T, Seely E, Williams G, and Adler G. 2008. Estradiol increases angiotensin II type 1 receptor in hearts of ovariectomized rats. *J Endocrinol* En prensa.
344. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, and Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
345. Riggs BL, and Hartmann LC. 2003. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 348(7):618-29.
346. Ritz MF, and Hausmann ON. 2008. Effect of 17beta-estradiol on functional outcome, release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats. *Brain Res* 1203:177-88.

347. Rhodes KE, Raivich G, and Fawcett JW. 2006. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience* 140(1):87-100.
348. Rola R, Mizumatsu S, Otsuka S, Morhardt DR, Noble-Haeusslein LJ, Fishman K, Potts MB, and Fike JR. 2006. Alterations in hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury in mice. *Exp Neurol* 202(1):189-99.
349. Rothwell NJ, and Strijbos PJ. 1995. Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int J Dev Neurosci* 13:179-185.
350. Rothstein RP, and Levison SW. 2005. Gray matter oligodendrocyte progenitors and neurons die caspase-3 mediated deaths subsequent to mild perinatal hypoxic/ischemic insults. *Dev Neurosci* 27(2-4):149-59.
351. Salomon DS, Ciardiello F, Valverius E, Saeki T, and Kim N. 1989. Transforming growth factors in human breast cancer *Biomed Pharmacother* 43(9):661-7.
352. Sandhir R, Onyszchuk G, and Berman NE. 2008. Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* 213(2):372-80.
353. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, and Logan A. 2004. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46:225-251.
354. Santagati S, Melcangi RC, Celotti F, Martini L, and Maggi A. 1994. Estrogen receptor is expressed in different types of glial cells in culture. *J Neurochem* 63(6):2058-64.
355. Sasaki T, Hirabayashi J, Many H, Kasai K, and Endo T. 2004. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology* 14(4):357-63.
356. Saunders-Pullman R. 2003. Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? *Endocrine* 21:81-87.
357. Sawada M, Suzumura A, and Marunouchi T. 1995. Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int J Dev Neurosci* 13:253-264.
358. Schneider S, Bosse F, D'Urso D, Muller H, Sereda MW, Nave K, Niehaus A, Kempf T, Schnolzer M, and Trotter J. 2001. The AN2 protein is a novel marker for the Schwann cell lineage expressed by immature and nonmyelinating Schwann cells. *J Neurosci* 21, 920–933.
359. Silver J, and Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
360. Simard AR, and Rivest S. 2007. Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol* 504(6):716-29.
361. Simpkins JW, Green PS, Gridley KE, Singh M, de Fiebre NC, and Rajakumar G. 1997. Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am J Med* 103:19S–25S.
362. Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, Simpkins CE, Greenwald D, Yu CJ, Bodor N, and Day AL. 1997. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg* 87(5):724-30.

363. Sharma K, and Mehra RD. 2008. Long-term administration of estrogen or tamoxifen to ovariectomized rats affords neuroprotection to hippocampal neurons by modulating the expression of Bcl-2 and Bax. *Brain Res* 1204:1-15.
364. Sherwin BB. 1996. Hormones, mood, and cognitive functioning in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 87 (2 Suppl):20S-26S.
365. Sherwin BB. 1997. Estrogen effects on cognition in menopausal women. *Neurology* 48:S21-S26.
366. Sherwin BB. 2005. Surgical menopause, estrogen, and cognitive function in women: what do the findings tell us? *Ann N Y Acad Sci* 1052:3-10.
367. Shughrue PJ, and Merchenthaler I. 2003. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* 116(3):851-61.
368. Smitherman KA, and Sontheimer H. 2001. Inhibition of glial Na⁺ and K⁺ currents by tamoxifen. *J Membr Biol* 181(2):125-35.
369. Stallcup WB. 1981. The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev Biol* 83:154-165.
370. Stallcup WB. 2002. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31:423-435.
371. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, and Bilfinger TV. 2000. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* 101(13):1594-7.
372. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Fimiani C, Welters I, Cadet P, Breton C, Pestel J, Salzet M, and Bilfinger TV. 1999. Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. *J Immunol* 163(7): 3758-63.
373. Stegmuller J, Werner H, Nave KA, and Trotter J. 2003. The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5- methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J Biol Chem* 278:3590-3598.
374. Steindler DA, and Laywell ED. 2003. Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* 43:62-69.
375. Steiniger B, Van der Meide PH. 1988. Rat ependyma and microglia cells express class II MHC antigens after intravenous infusion of recombinant gamma interferon. *J Neuroimmunol* 19(1-2):111-8.
376. Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134(Pt 2):127-136.
377. Stewart JH. 1994. End-stage renal failure appears earlier in men than in women with polycystic kidney disease *Am J Kidney Dis* 24(2):181-3.
378. Stoll G, and Jander S. 1999. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233-247.
379. Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Hajian H, and Finch CE. 1997. Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased apoE mRNA in vivo and *in vitro*. *Exp Neurol* 143:313-318.

380. Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Lopez LM, Shick J, and Finch CE. 2000. Effects of age on gene expression during estrogen-induced synaptic sprouting in the female rat. *Exp Neurol* 165:46–57.
381. Streit WJ. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133–139.
382. Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, and Sparks DL. 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45:208–212.
383. Streit WJ, Walter SA, and Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563–581.
384. Struble RG, Nathan BP, Cady C, Cheng X, and McAsey M. 2007. Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: an important role in neuronal regeneration. *Exp Gerontol* 42(1-2):54–63.
385. Sudo S, Wen TC, Desaki J, Matsuda S, Tanaka J, Arai T, Maeda N, and Sakanaka M. 1997. Beta-estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci Res* 29(4):345–54.
386. Suma T, Koshinaga M, Fukushima M, Kano T, and Katayama Y. 2008. Effects of in situ administration of excitatory amino acid antagonists on rapid microglial and astroglial reactions in rat hippocampus following traumatic brain injury. *Neurol Res* 30(4):420–9.
387. Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. 1983. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19(5):615–21.
388. Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A, and Salminen A. 2005. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. *Inflamm Res* 54:194–203.
389. Suzuki S, Gerhold LM, Böttner M, Rau SW, Dela Cruz C, Yang E, Zhu H, Yu J, Cashion AB, Kindy MS, Merchenthaler I, Gage FH, Wise PM. 2007. Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol* 500(6):1064–75.
390. Suzumura A, Meztitis SG, Gonatas NK, and Silberberg DH. 1987. MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of an antigen expression by gamma-interferon. *J Neuroimmunol* 15(3):263–78.
391. Szego CM, and Davis JS. 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 58(4):1711–8.
392. Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T, and Inoue M. 2004. Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey hippocampus. *Neurosci Lett* 369:9–13T.
393. Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, and Tsukada Y. 1988. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expresión of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res* 466:201–210.
- 394 Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J, and Chandross KJ. 2004. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J Neurochem* 89(3):660–73.
395. Takuma K, Baba A, and Matsuda T. 2004. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 72:111–127.

396. Tan AM, Zhang W, and Levine JM. 2005. NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J Anat* 207(6):717-25.
397. Tanzer L, Jones KJ. 1997. Gonadal steroid regulation of hamster facial nerve regeneration: effects of dihydrotestosterone and estradiol. *Exp Neurol* 146(1):258-64.
398. Tapia-González S, Carrero P, Pernia O, García-Segura LM, and Diz-Chaves Y. 2008. Tamoxifen and raloxifene, two selective oestrogen receptor modulators, reduce microglia reactivity in vivo alter peripheral inflammation. *J Endocrin* 198:219-30.
399. Tatsumi K, Haga S, Matsuyoshi H, Inoue M, Manabe T, Makinodan M, and Wanaka A. 2005. Characterization of cells with proliferative activity after a brain injury. *Neurochem Int* 46(5):381-9.
400. Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, and Zavala F. 1993. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and posttraumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 42:177-185.
401. Tatsumi K, Haga S, Matsuyoshi H, Inoue M, Manabe T, Makinodan M, and Wanaka A. 2005. Characterization of cells with proliferative activity after a brain injury. *Neurochem Int* 46(5):381-9.
402. Theodosis DT, Poulain DA, and Oliet SH. 2008. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 88(3):983-1008.
403. Thomas WE. 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 17:61-74.
404. Toft D, and Gorski J. 1966. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55(6):1574-81.
405. Toran-Allerand CD. 1991. Organotypic culture of the developing cerebral cortex and hypothalamus relevance to sexual differentiation. *Psychoneuroendocrinology* 16:7-24.
406. Uebelhart B, and Rizzoli R. 2008. Trends in osteoporosis. *Rev Med Suisse* 4:144-6, 148-9.
407. Vasudevan N, and Pfaff DW. 2008. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* 29(2):238-57.
408. Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, and Maggi A. 2006. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 147:2263-2272.
409. Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, and Maggi A. 2003. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(16):9614-9619.
410. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, and Maggi A. 2001. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 21:1809-1818.
411. Vegeto E, Pollio G, Pellicciari C, and Maggi A. 1999. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *FASEB J* 13:793-803.
412. Von Bartheld CS. 1999. Systematic bias in an "unbiased" neuronal counting technique. *Anat Rec* 257:119-120.

413. Wang JM, Irwin RW, and Brinton RD. 2006. Activation of estrogen receptor alpha increases and estrogen receptor beta decreases apolipoprotein E expression in hippocampus in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(45):16983-8.
414. Wang P, Rothwell NJ, Pinteaux E, and Brough D. 2008. Neuronal injury induces the release of pro-interleukin-1beta from activated microglia in vitro. *Brain Res En prensa*.
415. Wang Y, Feng H, Bi C, Zhu L, Pollard JW, and Chen B. 2007. GSK-3beta mediates in the progesterone inhibition of estrogen induced cyclin D2 nuclear localization and cell proliferation in cyclin D1-/- mouse uterine epithelium. *FEBS Lett* 581(16):3069-75.
416. Wang Y, Moges H, Bharucha Y, and Symes A. 2007. Smad3 null mice display more rapid wound closure and reduced scar formation after a stab wound to the cerebral cortex. *Exp Neurol* 203(1):168-84.
417. Watanabe M, Toyama Y, and Nishiyama A. 2002. Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *J Neurosci Res* 69(6):826-36.
418. Watson CS, and Gametchu B. 1999. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med* 220(1):9-19.
419. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, and Dorsa DM. 1997. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030-4033.
420. Watts CK, Sweeney KJ, Warlters A, Musgrove EA, and Sutherland RL. 1994. Anti-estrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 31(1):95-105.
421. Weibel ER. 1979. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir* 15:999-1013.
422. Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, and Ransom BR. 2000. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci* 20:6804-6810.
423. Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, and Butt AM. 2007. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J Anat* 210(6):661-70.
424. Wilson CM, and McPhaul MJ. 1994. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1234-1238.
425. Wise PM. 2003. Estrogens: protective or risk factors in brain function? *Prog Neurobiol* 69:181-191.
426. Wise PM, and Dubal DB. 2000. Estradiol protects against ischemic brain injury in middle-aged rats. *Biol Reprod* 63:982-985.
427. Woodroffe MN. 1995. Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45:S6-10.
428. Woolley CS. 1998. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav* 34(2):140-8.
429. Woolley CS, and McEwen BS. 1993. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol* 336:293-306.

430. Woolley CS, Wenzel HJ, and Schwartzkroin PA. 1996. Estradiol increases the frequency of multiple synapse boutons in the hippocampal CA1 region of the adult female rat. *J Comp Neurol* 373:108–117.
431. Wu D, Shibuya S, Miyamoto O, Itano T, and Yamamoto T. 2005. Increase of NG2-positive cells associated with radial glia following traumatic spinal cord injury in adult rats. *J Neurocytol* 34(6):459-69.
432. Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, and Duan S. 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25):15194-9.
433. Yawata I, Takeuchi H, Doi Y, Liang J, Mizuno T, and Suzumura A. 2008. Macrophage-induced neurotoxicity is mediated by glutamate and attenuated by glutaminase inhibitors and gap junction inhibitors. *Life Sci* 82(21-22):1111-6.
434. Yokoyama A, Sakamoto A, Kameda K, Imai Y, and Tanaka J. 2006. NG2 proteoglycan-expressing microglia as multipotent neural progenitors in normal and pathologic brains. *Glia* 53(7):754-68.
435. Zai LJ, and Wrathall JR. 2005. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 50(3):247-57.
436. Zhang W, Couldwell WT, Song H, Takano T, Lin JH, and Nedergaard M. 2000. Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 60(19):5395-400.
437. Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, and Appel SH. 2006. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem* 99(4):1176-87.
438. Zhang Y, Jin Y, Behr MJ, Feustel PJ, Morrison JP, and Kimelberg HK. 2005. Behavioral and histological neuroprotection by tamoxifen after reversible focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 196:41-46.
439. Zhang Y-Q, Shi J, Rajakumar G, Day AL, and Simpkins JW. 1998. Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res* 784:321–324.
440. Zhang Z, Cerghet M, Mullins C, Williamson M, Bessert D, and Skoff R. 2004. Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in oligodendrocytes. *J Neurochem* 89(3):674-84.
441. Zhong Y, and Bellamkonda RV. 2007. Dexamethasone-coated neural probes elicit attenuated inflammatory response and neuronal loss compared to uncoated neural probes. *Brain Res* 1148:15-27.
442. Zhu Z, Zhang Q, Yu Z, Zhang L, Tian D, Zhu S, Bu B, Xie M, and Wang W. 2007. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia *in vivo*. *Glia* 55(5):546-58.
443. Ziaja M, and Janeczko K. 1999. Spatiotemporal patterns of microglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development. *J Neurosci Res* 58:379-386.
444. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, and Carmignoto G. 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.